

**Universidade de Aveiro**

Departamento de Química

2011

**Ana Margarida  
Martins Salgueiro****Hidrogéis nanocompósitos de ouro para a  
libertação de fármacos**





Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2011

**Ana Margarida  
Martins Salgueiro**

## **Hidrogéis nanocompósitos de ouro para a libertação de fármacos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Tito da Silva Trindade, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me apoiou em tudo incondicionalmente, e aos meus avós falecidos dos quais sinto muita falta.



## **o júri**

Presidente

**Professora Doutora Maria Inês Purcell De Portugal Branco**  
*Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro*

**Professor Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar**  
*Investigador Auxiliar do Departamento de Ciências da Vida - Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra*

**Doutora Ana Luísa Daniel da Silva**  
*Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro*

**Professor Doutor Tito da Silva Trindade**  
*Professor Doutor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro*





## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de algum modo ajudaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Queria começar por agradecer à Doutora Ana Luísa e ao Professor Tito Trindade pela possibilidade que me foi concedida de realizar este trabalho, pelo apoio, disponibilidade e motivação.

Agradeço a todas as minhas colegas de laboratório por toda a ajuda e amizade. Agradeço à Mestre Sara Fateixa e à Doutora Ana Violeta Girão pela ajuda na síntese e caracterização de nanopartículas, e sugestões elucidativas. Agradeço ainda à Mestre Celeste Azevedo, pelo auxílio no manuseamento dos equipamentos de UV-Vis e FT-IR, e pelos resultados de caracterização térmica.

Como não podia deixar de ser, agradeço ainda à minha mãe, toda a força e todas as formas de apoio que me facultou, durante todo o meu percurso académico, pela paciência, apoio, motivação, carinho, etc. ... Sem ela tenho a certeza que este trabalho não teria sido possível.

Agradeço ainda a todos os meus amigos do fundo do meu coração pelo apoio, pela paciência, pela amizade... Vocês são muito importantes para mim e como é óbvio não podia deixar de vos mencionar.

Por fim queria agradecer ao Luís, pelo apoio, paciência, pelo sorriso...que me deram muita força e motivação.

Agradeço ainda à FCT pelo Programa Nacional de Re-equipamento Científico (REED/515/CTM/2005).

## palavras-chave

hidrogéis, nanobastonetes, nanocompósito, libertação controlada, gelatina,  $\kappa$ -carragenano

## resumo

Neste trabalho prepararam-se e caracterizaram-se hidrogéis termosensíveis nanocompósitos de gelatina e de  $\kappa$ -carragenano, contendo nanopartículas de ouro como fase dispersa e procedeu-se ao estudo da cinética de libertação de um fármaco modelo.

Estudou-se o efeito do teor e da morfologia (nanoesferas ou nanobastonetes) das nanopartículas de ouro nas propriedades ópticas, térmicas, intumescimento e propriedades mecânicas dos nanocompósitos. Os nanocompósitos apresentavam propriedades ópticas características da fase dispersa. Nos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano, a adição de nanopartículas resultou num aumento da temperatura de fusão do gel e num aumento do módulo elástico, indicando que as nanopartículas actuam como reforço da matriz polimérica. Nos nanocompósitos de gelatina observou-se o comportamento oposto, sugerindo um efeito de inibição da reticulação da gelatina por parte das nanopartículas. Os resultados sugerem que o intumescimento dos nanocompósitos depende da “força” do gel e do efeito de pressão osmótica, ambos dependentes do teor de nanopartículas no nanocompósito.

Por fim, realizaram-se estudos de libertação do azul de metileno em nanocompósitos seleccionados, à temperatura fisiológica. Os perfis de libertação obtidos foram analisados segundo os modelos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson-Crowell e cinéticas de ordem zero e de primeira ordem. De um modo geral o modelo de Korsmeyer-Peppas ajustou-se bem aos resultados experimentais e permitiu inferir sobre o mecanismo de libertação.



**keywords**

hydrogels, nanorods, nanocomposite, controlled release, gelatin,  $\kappa$ -carrageenan,

**Abstract**

In this work thermosensitive hydrogel nanocomposites of gelatin and  $\kappa$ -carrageenan containing gold nanoparticles as the disperse phase were prepared and characterized. The study of the release kinetics of a model drug was carried out.

The effect content and morphology (nanospheres or nanorods) of the gold nanoparticles on the optical, thermal, swelling and mechanical properties of the nanocomposites was studied.

The nanocomposites showed the optical properties of the nanoparticles used as dispersed phase. It was observed that the addition of nanoparticles to the  $\kappa$ -carrageenan nanocomposites increases the melting temperature and the elastic modulus of the gel, which means that the nanoparticles act as a reinforcement of the polymer matrix. However, in the case of the gelatin nanocomposites, an opposite behavior was observed suggesting that the nanoparticles inhibit the gelatin crosslinking of the gelatin. The swelling tests suggest that the nanocomposites swelling depend on the gel “strength” and on the osmotic pressure effect, both effects depending on the nanoparticles content of the nanocomposite.

Finally release studies of methylene blue as a model drug were carried out at the physiological temperature. The release profiles were analyzed using the Korsenmeyer-Peppas model, Higuchi model, Hixson-Crowell model and zero order and first order kinetics equations. Overall the Korsmeyer-Peppas model adjusted well to the experimental data and allowed to conclude about the release mechanism.



# Índice

Lista de Figuras .....	xvii
Lista de Tabelas .....	xxi
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	xxiii
Introdução e objectivos.....	1
1. Revisão Bibliográfica .....	3
1.1. Hidrogéis.....	3
1.1.1 Hidrogéis sensíveis à temperatura.....	5
i. Carragenano .....	7
ii. Gelatina .....	9
1.1.2. Libertação de fármacos em hidrogéis .....	12
1.2. Nanopartículas de ouro .....	19
1.2.1. Nanoesferas .....	20
1.2.2. Nanobastonetes.....	20
1.3. Hidrogéis nanocompósitos e aplicações na libertação de fármacos .....	22
2. Parte Experimental .....	25
2.1. Reagentes .....	25
2.2. Instrumentação .....	26
2.3. Síntese das nanoesferas de ouro.....	28
2.4. Síntese dos nanobastonetes de ouro .....	28
2.5. Preparação dos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano .....	30
2.6. Síntese dos nanocompósitos de gelatina .....	31
2.7. Testes de sorção .....	31
2.8. Ensaio de intumescimento.....	32
2.9. Ensaio de libertação .....	32
3. Resultados Experimentais e Discussão .....	35
3.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro.....	35
3.2. Hidrogéis nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano .....	41
3.2.1. Propriedades ópticas .....	41
3.2.2. Estrutura química .....	43

3.2.3. Propriedades térmicas e mecânicas.....	45
3.2.4. Intumescimento.....	48
3.3. Hidrogéis nanocompósitos de gelatina .....	52
3.3.1. Selecção do tipo de gelatina.....	52
3.3.2. Propriedades ópticas .....	53
3.3.3. Estrutura Química .....	54
3.3.4. Propriedades térmicas .....	57
3.3.5 Intumescimento .....	58
3.4. Ensaio de Libertação .....	60
3.4.1. Nanocompósitos de $\kappa$ -Carragenano.....	60
3.4.2. Nanocompósitos de Gelatina .....	63
4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro .....	67
5. Referências .....	69
Anexos.....	75
Anexo A – Gelatina .....	77
Anexo B - Modelação da cinética de libertação .....	79
B.1 - Modelação da cinética de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano.....	79
B.1.1.1- Modelação Cinética dos dados de libertação no Branco.....	79
B.1.1.2- Modelação Cinética dos dados de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano e nanoesferas de ouro, CNP(60ppm). .....	80
B.1.1.3- Modelação Cinética dos dados de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes curtos. ....	82
B.1.1.4- Modelação Cinética dos dados de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes longos. ....	83
B.2 – Modelação da cinética de libertação nos nanocompósitos de gelatina com nanocompósitos de ouro. ....	85
B.2.1 – Modelação dos dados de libertação para a gelatina não reticulada sem ouro, GP2. ....	85
B.2.2 – Modelação dos dados de libertação para a gelatina não reticulada com ouro, GP2(180ppm).....	86

### Introdução e objectivos

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar através da qual se tem desenvolvido uma variedade de novos materiais e dispositivos com propriedades interessantes para várias aplicações, tais como medicina, electrónica e produção de energia. Na nanomedicina, área da nanotecnologia relacionada com a medicina, procuram-se desenvolver ferramentas mais eficientes para o diagnóstico precoce de doenças (biosensores, imagiologia, etc) e para a terapia, como por exemplo sistemas de libertação de fármacos avançados.<sup>[1]</sup>

O desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos tem sofrido bastantes evoluções com a aplicação da nanotecnologia. A ideia é tentar ultrapassar as desvantagens já existentes nos sistemas actuais, como a necessidade de tentar manter os níveis de fármaco a concentrações constantes, evitar intoxicações por excesso de fármaco, evitar o desconforto de dosagens frequentes, etc. Os sistemas de libertação controlada remotamente, surgem com a finalidade de tentar ultrapassar estas problemáticas. O desenvolvimento de sistemas capazes de libertar um fármaco de modo controlado, prolongado e accionado por estímulos, surge como uma tecnologia capaz e com bastante potencial. A utilização de sistemas nanocompósitos para este fim, baseados em polímeros de origem natural e nanoestruturas de ouro, é ainda uma área na nanomedicina com muito para explorar, e daí o interesse inerente a esta área.<sup>[2, 3]</sup>

Neste contexto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de novos biomateriais com potencial para aplicação como sistemas de libertação de fármacos. A estratégia seguida consistiu na preparação de nanocompósitos baseados em hidrogéis termosensíveis de origem natural e contendo nanopartículas de ouro com diferentes morfologias (esferoidal e em forma de bastonete) como fase dispersa. Como matrizes poliméricas foram seleccionados o polissacarídeo *k*-carragenano e a gelatina, devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, e propriedades termosensíveis. O trabalho compreendeu o estudo do efeito do teor e da morfologia das nanopartículas de ouro nas propriedades ópticas, térmicas, mecânicas e de intumescimento do hidrogéis. Posteriormente testaram-se formulações seleccionadas de hidrogéis nanocompósitos na libertação de um composto modelo à temperatura fisiológica e estudou-se a cinética de libertação aplicando modelos cinéticos.





## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Hidrogéis

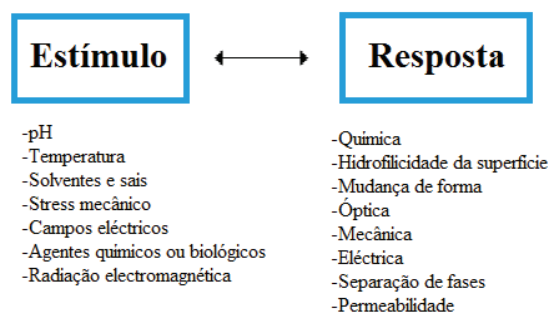
Hidrogéis são polímeros, que podem ter origem natural ou sintética, e cuja estrutura tridimensional é composta por redes poliméricas, hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água, sem se dissolverem. Este fenómeno, deve-se à sua estrutura química, que pode ter na sua constituição grupos funcionais hidrofílicos como  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$  e  $-SO_3H$ . Este tipo de polímeros deve ainda a sua insolubilidade à presença de reticulação, que pode ser química ou física.<sup>[4-8]</sup>

As suas propriedades, de biocompatibilidade e facilidade de controlo no transporte de solutos, tornam este tipo de sistemas poliméricos bastante atractivos para aplicações biomédicas, como por exemplo, sistemas de libertação de fármacos.<sup>[5]</sup>

Os hidrogéis podem ser classificados tendo em conta a sua origem, natural/sintética, a sua capacidade de absorver água, intumescimento baixo/médio/elevado, porosidade, tipo de reticulação, química/física, e biodegradabilidade. Existem ainda hidrogéis com capacidade de resposta a estímulos externos, o que acentua ainda mais o interesse em torno deste tipo de materiais. Nestes podem verificar-se pequenas alterações a nível “estrutural”, estimuladas por pequenas variações nas condições do meio envolvente, tais como variações de temperatura, pH, carga eléctrica, força iónica, luz UV-Vis, interacções iónicas ou metálicas ou combinação delas.<sup>[4, 9]</sup>

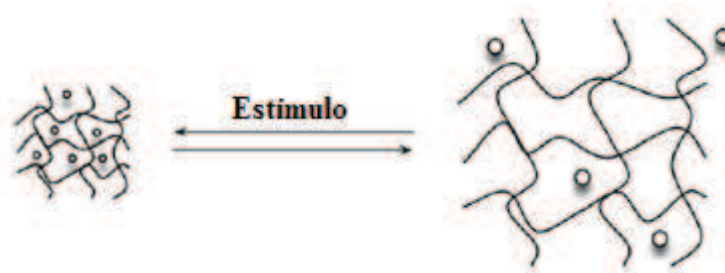
Estes estímulos podem levar a diferentes tipos de respostas, tais como a degradação, dissolução/precipitação ou intumescimento/colapso do gel, veja-se a figura 1.1.<sup>[4, 9]</sup>

Todos os estímulos apresentados são importantes, no entanto, são de destacar os hidrogéis sensíveis a variações de temperatura e pH. Este interesse advém do facto de, no corpo humano poderem ocorrer variações de temperatura, bem como de pH. Os desvios aos valores normais destes parâmetros, ao nível do corpo humano, podem funcionar como estímulo para transições de fase reversíveis, em hidrogéis.<sup>[4]</sup>



**Figura 1.1** - Esquema representativo de algumas respostas de hidrogéis a diferentes estímulos (adaptado de <sup>[4]</sup>).

Géis que exibam transição de fase em resposta a alterações do meio envolvente, como o pH, força iónica, temperatura e corrente eléctrica podem ainda ser designados por “géis inteligentes”.<sup>[4]</sup>Veja-se a figura 1.2.



**Figura 1.2** - Representação esquemática do processo de libertação, de um princípio activo, aprisionado num hidrogel, quando este é submetido a um dado estímulo (adaptado de <sup>[4]</sup>).

Polímeros inteligentes respondem a pequenas alterações no ambiente que os rodeia, com alterações significativas nas suas propriedades. A partir do esquema da figura 1.2 é possível compreender melhor o comportamento destes materiais.<sup>[4]</sup>

Estes polímeros, ao serem submetidos a um dado estímulo, sofrem um rearranjo das cadeias poliméricas, que pode traduzir-se numa transição de gel para solução (gel-sol), ou de solução para gel (sol-gel). Na fase de sol o sistema assume a forma de um fluido capaz de realizar escoamento, enquanto na fase gel, não se verifica escoamento, tem-se uma estrutura capaz de manter a sua integridade.<sup>[5]</sup>

Tendo em conta a figura 1.2, se na rede polimérica de um hidrogel encontrar-se aprisionado um princípio activo, ao verificar-se uma variação no meio, as cadeias poliméricas do hidrogel vão sofrer alterações na sua predisposição, através de rearranjos,

que podem resultar num aumento do espaço de movimentação para o princípio activo. Este como já não se encontra aprisionado, liberta-se e difunde-se para o meio envolvente.<sup>[4]</sup>

O desenvolvimento de pontos de reticulação física no polímero influencia a gelificação deste. Estes, idealmente, devem ser muito fortes, tendo em consideração as forças de dissolução do solvente.<sup>[4, 5]</sup>

Quando a gelificação é induzida pela temperatura, é possível determinar-se a temperatura de transição de fase, bem como a entalpia de gelificação.<sup>[5]</sup>

No caso de géis que respondem a estímulos externos com alterações nas suas propriedades, idealmente, a resposta ao estímulo deve ser reversível. Este facto faz dos géis reticulados quimicamente, bons candidatos para a sua utilização em aplicações de sistemas de libertação de fármacos, devido à sua boa estabilidade mecânica.<sup>[4]</sup>

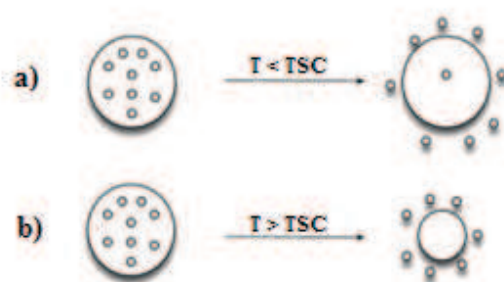
### **1.1.1 Hidrogéis sensíveis à temperatura**

Os hidrogéis termosensíveis, devido à sua capacidade de responder a variações de temperatura, são materiais de destaque no mundo do hidrogéis.<sup>[4]</sup>

Estes géis ao verificarem pequenas variações na temperatura, perto da sua temperatura de solução crítica, TSC, sofrem um rearranjo nas cadeias que pode traduzir-se num aumento dos espaços livres entre cadeias. Esta alteração ao nível das cadeias é resultado de rearranjos nas interacções entre as cadeias do gel e o meio aquoso.<sup>[4]</sup>

Quando estes géis atingem a TSC, verifica-se uma transição de fase, a transição de gel para sol ou sol para gel, consequência das alterações já referidas, que resulta ainda numa variação abrupta no volume do gel, à medida que a temperatura se aproxima ou se afasta da TSC.<sup>[4]</sup>

A ideia de um sistema capaz de detectar estes desvios e ao mesmo tempo libertar uma agente terapêutico é algo de grande interesse na área da libertação controlada de fármacos.<sup>[4]</sup>

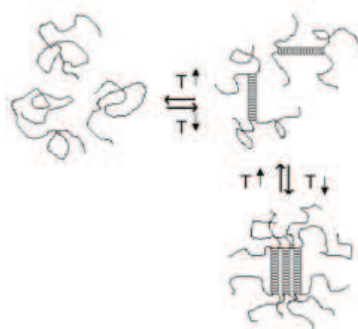


**Figura 1.3-** Esquema representativo de estratégias de liberação de fármacos utilizando hidrogéis termossensíveis.(adaptado de <sup>[4]</sup>)

Na figura 1.3 podem observar-se diferentes tipos de resposta, de diferentes hidrogéis. Em a) tem-se um princípio activo aprisionado num gel. Ao diminuir-se a temperatura abaixo da TSC, as cadeias do polímero sofrem um rearranjo possibilitando a movimentação e difusão do princípio activo. No caso de b), exemplifica-se um gel cujo processo funciona de modo contrário; o rearranjo das cadeias poliméricas e consequente liberação do princípio activo, ocorre para temperaturas superiores à TSC.<sup>[4]</sup>

A gelificação termoreversível verifica-se em vários polímeros, polímeros como a gelatina (proteína preparada a partir da hidrólise parcial do colagénio), polissacarídeos como a agarose e os carragenanos (ambos extraídos de algas vermelhas), amilose, amilopectina, derivados da celulose e o gelano (um polissacarídeo obtido a partir de bactérias). Todos estes biopolímeros têm a capacidade de absorver água e formar géis.<sup>[5]</sup>

A renaturação da conformação de hélice tripla na gelatina, e a conformação de hélice dupla nos polissacarídeos levam à nucleação e crescimento de cristalites durante a formação do gel. A elevadas temperaturas as cadeias encontram-se distribuídas de forma aleatória, e ao reduzir-se a temperatura, estas começam a formar as já referidas hélices duplas, e agregados que actuam como nós, pontos de junção físicos, tal como exemplificado na figura 1.4.<sup>[5]</sup>



**Figura 1.4-** Representação esquemática do mecanismo de gelificação de polissacarídeos na água.<sup>[5]</sup>

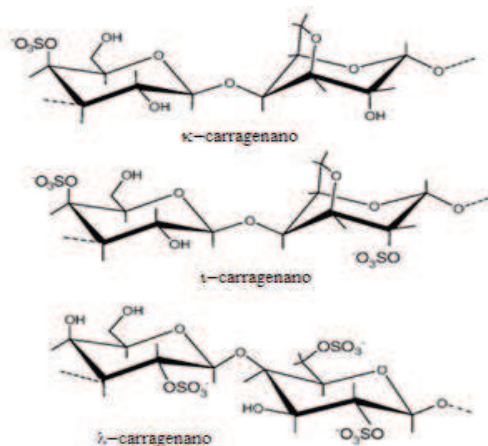
No entanto, tendo em conta, por exemplo, soluções aquosas de algas derivados de celulose, para estes verifica-se a termogelificação inversa. Isto é, a gelificação da solução de polímero ocorre com o aumento da temperatura. Este exemplo é idêntico ao já apresentado pela figura 1.3 a).<sup>[5]</sup>

Polímeros como a gelatina, e os carragenanos, neste caso o  $\kappa$ -carragenano, são hidrogéis termosensíveis de origem natural, muito utilizados em indústrias como a indústria alimentar, nos quais se irá focar o corrente trabalho.

## i. Carragenano

Os carragenanos são uma família de polissacarídeos, obtidos através de extracção, a partir de certas espécies de algas vermelhas. Os constituintes principais destas algas são carragenanos, co-polissacarídeos com uma estrutura linear constituída por  $\beta$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose parcialmente sulfatada.<sup>[9, 10]</sup>

Os vários carragenanos diferem entre si no número de grupos sulfato. Os carragenanos mais relevantes a nível comercial são, o  $\kappa$ -carragenano (mono-sulfato),  $\iota$ -carragenano (di-sulfato), e o  $\lambda$ -carragenano (tri-sulfato), veja-se a figura 1.5. Os dois primeiros formam, por norma, géis e o terceiro é utilizado como agente espessante.<sup>[9]</sup>



**Figura 1.5-** Estrutura das unidades de repetição do  $\kappa$ -carragenano,  $\iota$ -carragenano, e  $\lambda$ -carragenano.(adaptado de <sup>[9]</sup>)

Todos os carragenanos são solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. No entanto a sua solubilidade na água depende essencialmente do número de grupos sulfato (muito hidrofílicos), presentes na sua estrutura e da sua associação a catiões. O grupo principal de catiões que interagem com os carragenanos, inclui os iões sódio, potássio, cálcio e magnésio.<sup>[10]</sup>

A gelificação dos carragenanos em especial o  $\kappa$ -carragenano, consiste em dois passos, a transição de cadeia linear para dupla hélice devido ao arrefecimento e a subsequente agregação dependente de catiões, entre hélices.<sup>[10]</sup>

A presença do catião adequado, tipicamente o potássio ou o cálcio, é muito importante no processo de gelificação. Quer para o  $\iota$ - como para o  $\kappa$ -carragenano, os iões de metais alcalinos ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) todos são capazes de induzir a gelificação. No entanto o  $\text{K}^+$  e o  $\text{Rb}^+$  são considerados mais eficazes, que os outros iões, na indução da gelificação, para concentrações mais baixas, quer dos catiões, quer do carragenano.<sup>[10]</sup>

Relativamente ao ião potássio, este é capaz de introduzir-se entre a dupla hélice e à medida que as cargas do grupo sulfato vão sendo neutralizadas, facilitam a aproximação destas. Por esta razão o ião potássio estabiliza a dupla hélice. No caso do ião sódio, por exemplo, como este possui um diâmetro razoavelmente maior, este efeito já não se verifica.<sup>[10]</sup>

O ião potássio tem um efeito fortemente gelificante, mas o carragenano pode ainda formar géis através de outros iões, como já foi referido, obtendo-se como resultado uma

diferença ao nível da firmeza do gel. O gel formado pelo  $\kappa$ -carragenano é termoreversível e a sua temperatura de gelificação aumenta com a força iónica.<sup>[11, 12]</sup>

A proporção de fracções com grupos sulfato e o equilíbrio de catiões na água determinam ainda a viscosidade da solução e força do gel formado pelos carragenanos, o que constitui a característica mais explorada pelas indústrias alimentares e farmacêuticas em termos de aplicações como espessante gelificante e estabilizante.<sup>[10]</sup>

## ii. Gelatina

A gelatina é um polímero natural, derivado do colagénio, muito utilizado em aplicações médicas e farmacêuticas devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, em ambientes fisiológicos.<sup>[13, 14]</sup>

Apenas um certo conjunto de aminoácidos compõem a gelatina. Os aminoácidos mais relevantes ao nível da sua estrutura, por ordem decrescente de quantidade, são a glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutâmico, alanina, arginina, ácido aspártico, serina, lisina, leucina, fenilalanina, valina, treonina, isoleucina, hidroxilisina, histidina, metionina, tirosina. Para melhor compreensão desta distribuição e estrutura molecular, de cada aminoácido, veja-se a tabela A.1 do anexo A.<sup>[13]</sup>

A gelatina é produzida a partir do colagénio e dependendo do método utilizado na sua produção, podem obter-se dois tipos de gelatina: a gelatina do tipo B, quando o colagénio é submetido a um tratamento alcalino e a gelatina de tipo A, quando o colagénio sofre um tratamento ácido.<sup>[13, 14]</sup>

No processo alcalino os alvos são os grupos amida da asparagina e da glutamina, que sofrem hidrólise para grupos carboxilo, convertendo estes em aspartato e glutamato. Já no caso do processo ácido, este pouco afecta os grupos amida presentes.<sup>[13]</sup>

Como resultado do processo alcalino tem-se que a gelatina obtida é diferente, relativamente à sua carga, tendo em conta a gelatina obtida através de tratamento ácido. Isto acontece pois, do processo alcalino, resulta uma gelatina com muitos grupos carboxilo, explicando-se assim a sua carga negativa e o baixo ponto isoeléctrico (IEP). Já no caso da gelatina A, resultante do processo ácido, esta tem um IEP similar ao do colagénio.<sup>[13, 14]</sup>

Através destas técnicas de processamento pode obter-se gelatina com uma grande variedade de IEPs. Esta variedade de gelatina, com diferentes IEPs, resulta numa maior



flexibilidade do efeito de complexação de polião, de moléculas, carregadas positivamente ou negativamente.<sup>[8, 13]</sup>

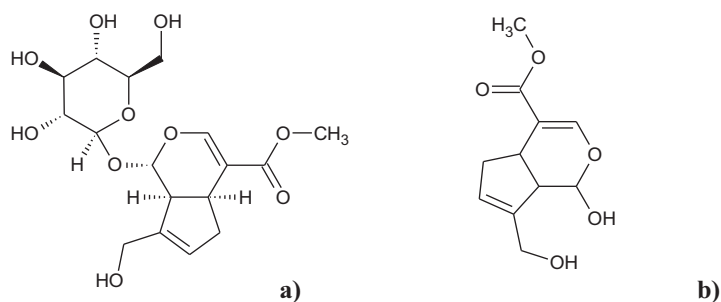
Por exemplo, gelatina ácida com um IEP de 5.0 deve utilizar-se como matriz de transporte de proteínas básicas, enquanto gelatina básica com um IEP de 9.0 deve utilizar-se para a libertação de proteínas ácidas.<sup>[8, 13]</sup>

A reticulação da gelatina pode ser um factor muito importante, pois melhora a sua estabilidade em meio aquoso e melhora ainda a sua estabilidade mecânica e térmica em condições fisiológicas.<sup>[14]</sup>

A gelatina pode sofrer reticulação física ou reticulação química. Os métodos de reticulação física incluem a utilização de microondas, tratamentos de desidratação térmica, e radiação UV. A principal vantagem deste tipo de reticulação reside no facto de não serem potencialmente perigosos, enquanto que a principal desvantagem está relacionada com o menor controlo existente sobre o grau de reticulação pretendido.<sup>[14]</sup>

Relativamente à reticulação química, os agentes reticulantes mais utilizados na reticulação da gelatina podem ser aldeídos (como o formaldeído, glutaraldeído, gliceraldeído, entre outros), compostos poli(epóxi) e carbodiimidas. A maior limitação da utilização de reticulação química advém da presença do reticulante que ficou por reagir no seio da matriz polimérica, o que pode criar um risco de formação de compostos tóxicos, por reacção do reticulante residual com outros substratos, durante a biodegradação da matriz polimérica. Esta limitação remete-nos para a importância da utilização de reticulantes com baixa toxicidade.<sup>[14]</sup>

A genipina é um composto obtido através da geniposida originária dos frutos da gardénia (figura 1.6). Tem baixa toxicidade e recentemente descobriu-se ser capaz de reticular com sucesso proteínas contendo resíduos de aminas primárias, como a gelatina.<sup>[13, 15]</sup>



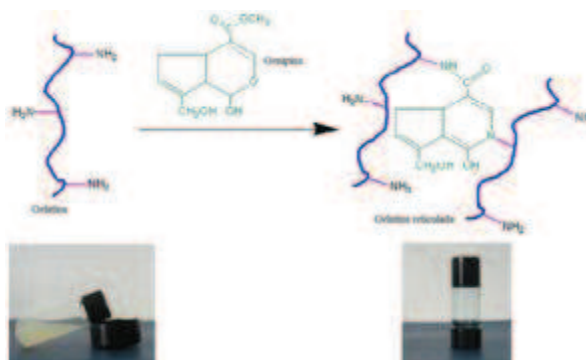
**Figura 1.6-** Representação da estrutura molecular da Geniposida (a) e da genipina (b) <sup>[16]</sup>

O mecanismo de reacção de reticulação da genipina com a gelatina dá-se em duas reacções, envolvendo dois locais diferentes da molécula da genipina. Numa reacção tem-se primeiramente o ataque nucleofílico do carbono C3 da genipina, por parte de um grupo amina primário (presente nos aminoácidos da gelatina), para formar um grupo aldeído intermédio. A amina secundária acabada de formar reage com o grupo aldeído, dando origem a um composto heterocíclico, veja-se no anexo A, na figura A.1 o mecanismo de reacção I. <sup>[14, 17]</sup>

Uma segunda reacção consiste na substituição nucleofílica, que envolve a substituição do grupo éster na gelatina, por uma ligação de amida secundária, veja-se o mecanismo de reacção II, no Anexo A, figura A.1. <sup>[14, 17]</sup>

A reacção de reticulação da gelatina com a genipina pode ainda ser comprometida pela polimerização radicalar da genipina, que é induzida pela presença de radicais de oxigénio. <sup>[14, 18]</sup>

A figura 1.7 representa a reacção de reticulação da gelatina com a genipina. Observa-se a alteração da coloração da gelatina após a reticulação. Quanto mais reticulada a gelatina estiver, mais azul-escuro fica, dado que o produto da reacção com a genipina apresenta coloração azul e como tal a reticulação da gelatina pode ser “avaliada” através da sua coloração. <sup>[14, 18]</sup>



**Figura 1.7-** Representação ilustrativa da reacção de reticulação da gelatina pela genipina. (adaptado de <sup>[15]</sup>)

Esta reacção é ainda influenciada pela temperatura e pelo tempo de incubação a que a gelatina e genipina são expostas a essa mesma temperatura. <sup>[19]</sup>

### 1.1.2. Liberação de fármacos em hidrogéis

Nas últimas décadas, os avanços em tecnologias de hidrogéis têm incitado o seu desenvolvimento, para uma diversidade de aplicações biomédicas como sistemas de liberação de fármacos.<sup>[20]</sup>

A base de um bom sistema de liberação não assenta apenas no desenvolvimento da estrutura polimérica do hidrogel, mas também nos perfis de liberação de um fármaco. De um modo geral, um polímero constituído por monómeros bem conhecidos quimicamente, resulta num hidrogel com propriedades físico-químicas bem definidas e perfis de liberação reprodutíveis.<sup>[20]</sup>

A análise matemática quantitativa das propriedades do material permite-nos ter em atenção parâmetros de interação, fenómenos cinéticos e fenómenos de transporte no interior da rede polimérica, que também são importantes no desenvolvimento de um hidrogel. Para além disso, a modelação matemática dos perfis de liberação acelera o desenvolvimento de novos sistemas uma vez que limita o trabalho experimental necessário realizar, para melhor compreensão do mecanismo de liberação que rege um dado sistema de liberação.<sup>[20]</sup>

Tal como já foi discutido anteriormente, os hidrogéis têm uma combinação única de características que os torna muito úteis em aplicações de liberação de fármacos. Devido à sua hidrofilicidade, os hidrogéis conseguem absorver grandes quantidades de água, e portanto, o mecanismo de liberação em hidrogéis torna-se bastante diferente do mecanismo de liberação para polímeros hidrofóbicos.<sup>[20, 21]</sup>

As propriedades físico-químicas da rede do hidrogel, a escolha do fármaco, ou o método utilizado para inserir o fármaco na matriz, podem determinar o mecanismo de liberação.<sup>[20, 21]</sup>

A compreensão dos mecanismos e identificação dos parâmetros chave que governam a liberação do fármaco, a partir de hidrogéis, são o primeiro passo para prever, de modo mais rigoroso, perfis de liberação.<sup>[20, 21]</sup>

No caso de géis porosos, quando o tamanho dos poros é muito superior ao tamanho das moléculas de fármaco, o coeficiente de difusão pode relacionar-se com a porosidade e tortuosidade do hidrogel. No entanto para hidrogéis “não-porosos”, os coeficientes de difusão do fármaco diminuem devido ao impedimento provocado pelas cadeias poliméricas, da rede polimérica. Nestes casos, o volume livre médio por molécula para o

fármaco é menor, o arrastamento hidrodinâmico experimentado pelo fármaco é maior, e o percurso de difusão do fármaco também é maior, quando comparado com o percurso em hidrogéis com poros de dimensões muito superiores ao fármaco.<sup>[20]</sup>

Existem muitos modelos matemáticos criados para tentar prever, quantitativamente, a libertação de um dado fármaco em função do tempo, a partir de sistemas baseados em hidrogéis. Estes modelos podem ter como base um passo limitante à libertação do princípio activo, e esse passo limitante pode basear-se em:<sup>[20]</sup>

1. Controlo por difusão
2. Controlo por intumescimento
3. Controlo químico

O mecanismo controlado por difusão é o mais utilizado na descrição da libertação de um princípio activo, a partir de hidrogéis. A lei de Fick para a difusão, com coeficientes de difusão variáveis ou constantes, é utilizada normalmente na modelação deste mecanismo. As difusividades dos fármacos são usualmente determinadas empiricamente ou estimadas *a priori*, através de teorias baseadas no volume livre, hidrodinâmica, etc.<sup>[20]</sup>

Relativamente ao mecanismo da libertação controlado por intumescimento, este ocorre quando a difusão do fármaco é mais rápida que o intumescimento do hidrogel, isto é, que a relaxação das cadeias poliméricas. A modelação deste tipo de mecanismo envolve, usualmente, condições de fronteira onde ocorre a libertação do fármaco, na zona de interface do hidrogel intumescido.<sup>[20]</sup>

Por fim, no caso de mecanismos de libertação por controlo químico, estes utilizam-se para descrever a libertação de princípios activos, onde as reacções químicas que ocorrem no seio da matriz são o passo limitante da libertação. No caso dos hidrogéis, as reacções mais comuns são reacções de clivagem das cadeias poliméricas por degradação hidrolítica ou enzimática, ou reacções reversíveis ou irreversíveis entre o polímero e o princípio activo a libertar. Sob certas circunstâncias, a erosão da superfície ou do interior do hidrogel é a etapa de controlo da velocidade de libertação do fármaco.<sup>[20]</sup>

## Modelação da cinética de libertação

### Cinética de ordem zero

A cinética de ordem zero é descrita pela equação 1.1, <sup>[22, 23]</sup>

$$Q = Q_0 + k_0 t \quad \text{Equação 1.1}$$

onde  $Q$  é a quantidade de fármaco libertada ou dissolvida para um tempo  $t$ ,  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco em solução e  $k_0$  a constante cinética de ordem zero. <sup>[23]</sup>

Os parâmetros cinéticos são calculados representando a fracção cumulativa de fármaco libertado em função do tempo. <sup>[22, 23]</sup>

A cinética de ordem zero tem sido utilizada para descrever a libertação de fármacos, a partir de formas de dosagem farmacêutica que não se desagregam e para sistemas que fazem uma libertação lenta do fármaco. Pode ser utilizada para descrever a dissolução de um fármaco, que se apresenta em diferentes tipos de formas de dosagem, como no caso de sistemas como comprimidos revestidos cuja matriz esta carregada com fármacos de baixa solubilidade, sistemas osmóticos, etc. <sup>[22]</sup>

### Cinética de primeira ordem

A cinética de 1ª ordem pode ser utilizado para descrever a absorção e/ou eliminação de alguns fármacos. Esta cinética adequa-se a sistemas em que a velocidade de libertação depende da concentração do fármaco. <sup>[24]</sup>

A equação que descreve esta cinética é dada pelas equações 1.2 e 1.3. <sup>[22]</sup>

$$\frac{dQ}{dt} = kt \quad \text{Equação 1.2}$$

$$\ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = kt \quad \text{Equação 1.3}$$

Onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco libertada no tempo  $t$ ,  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco em solução e  $k$  é a constante de libertação de primeira ordem. A representação gráfica do logaritmo da fracção cumulativa de fármaco libertado, em função do tempo é linear. <sup>[23]</sup>

Esta cinética é muito utilizada para descrever a dissolução de fármacos, em formas de dosagem farmacêutica contendo fármacos solúveis em água e matrizes porosas, em que a quantidade de fármaco libertado é proporcional à de fármaco que ficou por libertar.<sup>[22, 23]</sup>

### Modelo de Korsmeyer-Peppas

O modelo Korsmeyer-Peppas é um modelo capaz de descrever a libertação de um fármaco, a partir de um sistema polimérico, nomeadamente na libertação a partir de matrizes hidrofilicas como hidrogéis.<sup>[25]</sup>

O modelo é dado pela equação 1.4.

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad \text{Equação 1.4}$$

Onde  $M_t/M_0$  é a fracção cumulativa de fármaco libertado,  $k$  é uma constante estrutural/geométrica que depende do sistema de libertação e  $n$  é designado como o expoente de libertação, e está relacionado com o mecanismo de libertação.<sup>[20]</sup>

Os dados experimentais são representados do modo  $\ln(M_t/M_0)$  em função de  $\ln(t)$  para  $\frac{M_t}{M_0} \leq 60\%$ .<sup>[22]</sup>

A partir do valor de  $n$ , tendo em conta a geometria da matriz, é possível inferir qual o modelo de transporte que rege a libertação do fármaco. O valor de  $n$  depende da geometria do veículo libertador, plana, cilíndrica e esférica. Na tabela 1.1 encontra-se a tabela de valores de  $n$  relativamente à geometria plana.<sup>[20, 23]</sup>

**Tabela 1.1**– Tabela de correspondência entre o parâmetro  $n$  e os respectivos mecanismos de libertação associados ao seu valor, tendo em conta a geometria plana (adaptado de <sup>[24]</sup>)

$n$	Mecanismo de Libertação
$<0.5$	Quasi Fickiano
0.5	Fickiano (controlo por difusão)
	Caso I
$0.5 < n < 1$	Anómalo
1	Não Fickiano, Caso II (libertação segundo o modelo ordem zero)
	(controlo por intumescimento)
$n > 1$	Não Fickiano Super Caso II

Este modelo pode ser visto como uma generalização da observação da sobreposição de dois mecanismos independentes, uma difusão fickiana e fenómenos de transporte caso II.<sup>[23, 25]</sup>

Descreve em muitos casos a dinâmica de intumescimento e a libertação em polímeros vítreos, independentemente da forma da equação e o tipo de combinação existente entre os fenómenos de relaxação e difusão.<sup>[23, 25]</sup>

Verifica-se que quando  $n$  é igual a 1, para geometria plana, a velocidade de libertação é independente do tempo. Este caso corresponde à cinética de libertação de ordem zero. O mecanismo que origina a libertação segundo uma cinética de ordem zero, é conhecida como caso II de transporte. Aqui o processo de relaxamento do polímero ocorre à medida que se verifica a absorção de água por parte deste (intumescimento). Este passo é o que controla todo o processo de libertação do fármaco.<sup>[23, 25]</sup> A água actua como plasticizante, o que resulta na diminuição da temperatura de transição vítrea do polímero. Quando a  $T_g$  iguala a temperatura do sistema, verifica-se a passagem de estado vítreo para “borracha”, com o aumento da mobilidade das cadeias poliméricas e expansão do volume.<sup>[23, 25]</sup>

Quando  $n=0.5$  tem-se que o sistema de libertação é controlado por difusão. Os valores de  $n$  entre 0.5 e 1, podem ser vistos como um indicador de sobreposição de ambos os fenómenos, designado por transporte anómalo. Veja-se que estes dois extremos de  $n$ , 0.5 e 1, são válidos apenas para geometria plana. Para geometria cilíndrica e esférica derivaram-se os valores, como se pode ver na tabela 1.2.<sup>[23, 25]</sup>

**Tabela 1.2-** Valores de  $n$  e os respectivos mecanismos de libertação para diferentes geometrias.<sup>[20, 23, 25]</sup>

Geometria	Plana	Cilíndrica	Esférica	Mecanismo
Valores de $n$	0.5	0.45	0.43	Difusão Fickiana, Caso de Transporte I, (sistemas com controlo por difusão)
	$0.5 < n < 1$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Mecanismo de transporte anómalo
	1	0.89	0.85	Caso de Transporte II (sistemas com controlo por intumescimento)

### Modelo de Higuchi

Outro modelo desenvolvido para a libertação de fármacos a partir de uma matriz foi proposto por Higuchi. Inicialmente foi desenvolvido para geometria plana, no entanto, mais tarde, foi alargado a diferentes geometrias e sistemas porosos.<sup>[23, 25]</sup>

Este modelo explica a libertação de fármacos solúveis e pouco solúveis em água, a partir de uma grande variedade de matrizes.<sup>[23, 25]</sup>

Este modelo baseia-se nas seguintes hipóteses, i) a concentração de fármaco na matriz é superior à solubilidade do fármaco, ii) a difusão do fármaco ocorre de modo unidimensional, iii) as partículas de fármaco são muito mais pequenas que a espessura do sistema, iv) o intumescimento e degradação da matriz são processos desprezados, v) a difusividade do fármaco é constante, vi) e boas condições de imersão do sistema.<sup>[23, 25]</sup>

A expressão que descreve o modelo de Higuchi, na sua forma mais generalizada, é dada pela equação 1.5, é seguida principalmente quando a libertação do fármaco depende da difusão.<sup>[23, 25]</sup>

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2} \quad \text{Equação 1.5}$$

Onde  $k_H$  é a constante de dissolução de Higuchi,  $M_t/M_\infty$  é a fracção cumulativa de libertação do fármaco e  $t$  o tempo. É igual à relação de Korsmeyer-Peppas para  $n=0.5$ , ou seja, quando o mecanismo de libertação neste modelo é controlado por difusão.<sup>[23, 25]</sup>

A fracção cumulativa de libertação do fármaco, obtida através de dados experimentais, é representada em função da raiz quadrada do tempo.<sup>[23, 25]</sup>

Este modelo pode-se aplicar para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas de dosagem farmacêuticas, como no caso de sistemas transdérmicos e matrizes de comprimidos com fármacos solúveis em água.<sup>[22]</sup>

### Modelo de Hixson-Crowell

Hixson e Crowell propuseram a equação 1.6, onde  $M_0$  representa a quantidade de fármaco inicialmente presente na forma de dosagem farmacêutica,  $M$  é a quantidade de fármaco que ainda permanece na forma de dosagem farmacêutica, que ainda não foi libertada no tempo  $t$ ,  $k$  é a constante que incorpora a relação superfície/volume. A equação



descreve a libertação onde se verificam variações na área de superfície e diâmetro das partículas dos sistemas de libertação.<sup>[22, 23]</sup>

A forma geométrica da forma de dosagem farmacêutica mantém-se constante, à medida que ocorre a dissolução, depois dá-se a dissolução em planos paralelos à superfície da geometria da forma de dosagem. A velocidade de dissolução é baseada na raiz cúbica da massa de fármaco.<sup>[22, 23]</sup>

$$M_0^{1/3} - M^{1/3} = kt \quad \text{Equação 1.6}$$

Este modelo aplica-se a formas farmacêuticas de dosagem tais como comprimidos, onde a dissolução ocorre em planos que são paralelos à superfície do fármaco, se as dimensões do comprimido diminuírem proporcionalmente, de tal modo que a forma geométrica inicial permanece constante com o tempo.<sup>[22, 23]</sup>

### Outros modelos

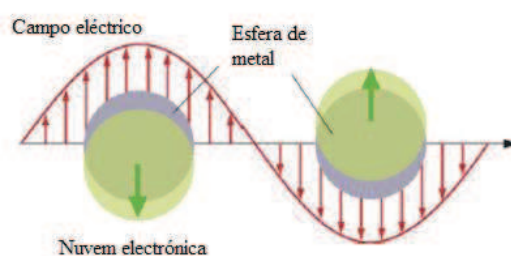
Existem ainda outros modelos de libertação de fármacos disponíveis na literatura, que não foram considerados para a análise dos perfis de libertação neste trabalho, por não se considerarem adequados aos sistemas em estudo. É o caso do modelo de Baker-Lonsdale desenvolvido a partir do modelo de Higuchi, que descreve a libertação controlada de um fármaco a partir de uma matriz esférica, como microcápsulas e microsferas. O modelo de Weibull também não foi considerado. Apesar de amplamente aplicado a estudos de processos de libertação, trata-se de um modelo empírico sem fundamento cinético que pouco contribui para a compreensão dos mecanismos de libertação.<sup>[22, 23]</sup>

## 1.2. Nanopartículas de ouro

Nos últimos anos, tem-se verificado um crescente interesse em volta das nanopartículas de ouro. As suas propriedades ópticas, químicas e biológicas despertam grande interesse clínico para aplicações na medicina. A capacidade das nanopartículas de ouro se ligarem a uma grande variedade de moléculas orgânicas, a sua baixa toxicidade e a sua forte e ajustável absorção óptica, são exemplos de algumas das suas propriedades mais relevantes.<sup>[26, 27]</sup>

A interacção da luz com a matéria contendo partículas, envolve a sua dispersão e ou absorção, em que ambas causam o enfraquecimento da intensidade do feixe que passa pelo meio. O efeito de Tyndall fala disto no seu conteúdo tendo em conta numa solução coloidal, o modo como as partículas em suspensão interagem os feixes de luz, explicando a sua aparência. Também para o caso de soluções coloidais de nanopartículas se verificam fenómenos de interacção da luz com estas. No entanto as propriedades ópticas especiais da nanopartículas de metais nobres, de grande interesse para inúmeras aplicações, devem-se ao efeito de ressonância de plasmão de superfície (SPR).<sup>[26, 27]</sup>

Este fenómeno ocorre quando um campo magnético, ao interagir com electrões condutores da superfície de nanopartículas, induz a sua oscilação. Como resultado verifica-se uma forte banda de absorção numa zona do espectro electromagnético, que depende do tamanho da partícula, veja-se a figura 1.8. Esta zona, no caso nas nanopartículas de ouro e de prata pode encontrar-se na região visível do espectro electromagnético.<sup>[26, 27]</sup>



**Figura 1.8** - Representação esquemática da interacção entre nanoesferas de ouro e a luz, que leva à oscilação dos electrões de condução na superfície da nanopartículas (adaptado de <sup>[28]</sup>)

Este efeito de ressonância de plasmão de superfície traduz-se em excitações electromagnéticas dispersivas, propagantes, na interface que desvanecem na direcção perpendicular, figura 1.8.<sup>[26, 27]</sup>

A forma e o tamanho das nanopartículas, afecta o modo como estas interagem com a luz. Diferente tamanho e forma significam diferente modo de dispersar/absorver a luz, o que por consequência traduz-se em diferentes propriedades ópticas.<sup>[27]</sup>

A dispersão de luz é muitas vezes acompanhada de absorção, pelo meio da qual, dependendo do tipo de material, certas frequências são absorvidas e dissipadas, ou na forma de calor, ou através de outros processos internos na nanopartículas.<sup>[27]</sup>

Existem vários tipos de nanopartículas de ouro com diferente tamanho, forma, e propriedades físicas. Inicialmente começou-se pelo estudo de nanoesferas de ouro, e pouco depois começou a variar-se a forma das nanopartículas para nanobastonetes, *nanoshells* ou até nanofios de ouro. No entanto, no presente trabalho, estarão apenas em foco as nanoesferas e os nanobastonetes de ouro.<sup>[26, 29]</sup>

### 1.2.1. Nanoesferas

As nanoesferas de ouro, também conhecidas como ouro colóide, podem ter diâmetros variáveis entre 2 a 100nm. Nestas partículas verifica-se o efeito de ressonância de plasmão, figura 1.8, que para este caso, resulta numa larga banda de absorção na região visível do espectro electromagnético, perto dos 520nm.<sup>[26, 30]</sup>

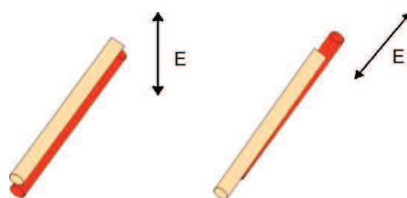
As nanoesferas de ouro podem ser sintetizadas através de redução de uma solução aquosa de ácido cloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ), utilizando diferentes agentes redutores sob diferentes tipos de condições de reacção. O agente redutor mais comum é o citrato. O tamanho das nanoesferas pode ser controlado através da variação do rácio citrato/ouro. Usualmente quantidades mais pequenas de citrato resultam em nanoesferas maiores.<sup>[30]</sup>

### 1.2.2. Nanobastonetes

Para além de nanopartículas com morfologia esférica existem também nanopartículas em forma de bastonetes. Como já foi referido, alterações na forma ou tamanho de nanopartículas resultam em alterações das suas propriedades ópticas. Ao variar-se a forma de esferas para bastonetes, verifica-se que as características ópticas das nanopartículas vão ser diferentes.<sup>[28]</sup>

Os nanobastonetes de ouro, para além da banda do efeito de plasmão de superfície perto dos 520nm, que corresponde à oscilação de plasmão transversal, apresentam ainda

uma banda a comprimentos de onda superiores, derivada da oscilação dos electrões condutores ao longo do eixo longitudinal dos nanobastonetes. Veja-se a figura 1.9. Esta banda relativa ao efeito de plasmão longitudinal, pode ser deslocada até à região de NIR, através do aumento da razão de aspecto dos nanobastonetes.<sup>[28]</sup>



**Figura 1.9-** Figura representativa da oscilação dos electrões condutores aquando o efeito de plasmão de superfície transversal e longitudinal<sup>[27]</sup>

A reacção de síntese de nanobastonetes de ouro envolve a redução de uma solução aquosa de Au(III). Inicialmente os átomos de ouro formam um núcleo de tamanho muito pequeno, “sub-nano”, durante a primeira fase de nucleação.<sup>[27]</sup>

Mais tarde, os átomos de Au reduzidos fixam-se a estes núcleos, levando ao seu crescimento. A agregação das partículas evita-se através da agitação vigorosa do sistema e também através de agentes estabilizantes. A concentração dos reagentes, temperatura e pH, influenciam a cinética de nucleação e crescimento e consequentemente o controlo no tamanho, forma, e estrutura nas nanopartículas.<sup>[27]</sup>

Este método, bastante utilizado, e em destaque neste trabalho, para a síntese de nanobastonetes, é denominado por *Seed-Mediated Growth Method* (método de crescimento de sementes). Neste método de redução electroquímica, a utilização de agentes surfactantes, como o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), ou misturas binárias de surfactantes de CTAB e cloreto de benzildimetilhexadecilamónio (BDAC), em solução, origina soluções coloidais de nanobastonetes. Como se pode ver no esquema de reacção dado pela figura 1.10, a síntese de nanobastonetes realiza-se a partir de uma solução de crescimento, onde se adiciona solução aquosa de ácido cloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ), e um agente redutor suave, como o ácido ascórbico. A esta solução adiciona-se, posteriormente, solução de sementes. Estas sementes vão funcionar como núcleos de crescimento, onde o ouro reduzido, ainda em solução, vai fixar-se.<sup>[27]</sup>

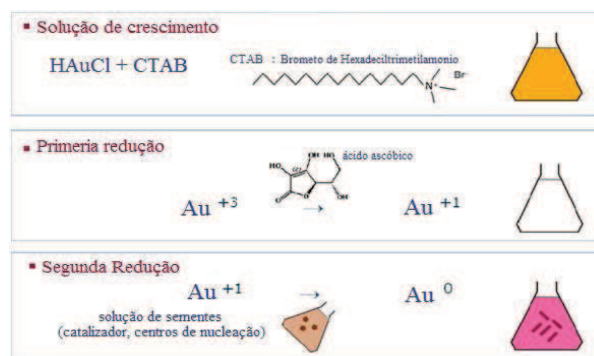


Figura 1.10 – Representação esquemática da síntese da nanobastonetes de ouro. (adaptado de [27])

### 1.3. Hidrogéis nanocompósitos e aplicações na libertação de fármacos

A tecnologia de libertação de fármaco tem evoluído muito, de modo a tentar ultrapassar algumas falhas dos sistemas de libertação convencionais, exemplo disso seria a dificuldade em manter os níveis de dado fármaco dentro de um intervalo de concentrações, de modo a evitar a toxicidade inerente ao seu excesso. Para além disso, fármacos que necessitam de administração frequente, ou contínua, de modo a conseguir-se um efeito longo e prolongado, muitas vezes traduzem-se no desconforto do paciente, ou na necessidade de utilização de cateteres, para aplicação de dispositivos externos.<sup>[3]</sup>

Com a utilização de sistemas de libertação controlada, uma dose apenas consegue sustentar os níveis de fármaco dentro dos índices desejados e por *longos* períodos de tempo. Posto isto, torna-se importante o desenvolvimento de dispositivos de libertação que tenham bastante reprodutibilidade e constantes de libertação, constantes *in vitro* e *in vivo*.<sup>[3]</sup>

Mais recentemente tem crescido o interesse no desenvolvimento de métodos de libertação que possam ser controlados de modo directo, accionados ou por interacção de materiais inteligentes devido a variações do meio que os envolve, através do operador, ou a partir de um dispositivo remoto que afecta o sistema de libertação. Idealmente este tipo de sistemas pode ser capaz de determinar o *timing*, duração, dosagem, e até o local de libertação. Possibilita ainda accionar a libertação do fármaco, de modo remoto, não evasivo, repetido e confiável.<sup>[3]</sup>

Com base nestas ideias, têm vindo a desenvolver-se materiais nanocompósitos com diversas propriedades, tais como sensibilidade óptica, a campos magnéticos, a ultra-sons e eléctrica. Muitos destes sistemas são conseguidos através inserção de certas nanoestruturas,

com este tipo de propriedades, numa determinada matriz, de modo que os materiais resultantes também as possuam.<sup>[3]</sup>

O presente trabalho apenas irá focar-se no estudo de materiais nanocompósitos com características relacionadas com a sensibilidade óptica e de temperatura.<sup>[3]</sup>

No caso particular das nanopartículas de ouro, devido às suas propriedades ópticas, são capazes de absorver radiação num comprimento de onda característico, podendo dissipar parte dessa radiação na forma de calor. Como tal a conjugação destas nanoestruturas com polímeros termosensíveis, poderá permitir a obtenção de um sistema de libertação controlada promissor. Os polímeros utilizados como matriz nestes sistemas, baseia-se em polímeros sensíveis à temperatura. A estes adiciona-se este tipo de nanoestruturas, sensíveis à radiação com um dado comprimento de onda. Ao submeter-se o nanomaterial a essa radiação, pode promover-se o aquecimento localizado do material, que pode resultar numa transição de fase da matriz polimérica e na consequente libertação do princípio activo aprisionado no material nanocompósito. Estes materiais devem, preferencialmente, absorver radiação dentro da gama do infravermelho próximo, ao qual o nosso corpo é transparente, proporcionando-se assim todas as condições para o desenvolvimento de um sistema de libertação accionado através de um estímulo óptico, externo.<sup>[3]</sup>

Estes tipos de sistemas de libertação controlada podem ser aplicados na medicina, como por exemplo, na terapêutica do cancro. Actualmente existem poucos estudos com sistemas nanocompósitos de ouro baseados em polímeros de origem natural como tal trata-se de uma área bastante inexplorada.<sup>[2, 3]</sup>

Por fim, pretendeu-se ainda realizar estudos de cinética de libertação nestes materiais, de modo a compreender o efeito da temperatura, na libertação de um fármaco modelo a partir destes materiais.



## 2. Parte Experimental

### 2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados em todo o procedimento experimental, encontram-se listados abaixo.

- $\kappa$ -carragenano (Fluka);
- Ácido ascórbico (José M.Vaz Pereira S.A.);
- Ácido cloroáurico (III) trihidratado, pureza 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Azul de metileno (Riedel-de Haën);
- BDAC, cloreto de benzildimetilamónio (Sigma-Aldrich);
- Citrato de sódio (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de Potássio, pureza 99% (Sigma-Aldrich);
- CTAB, brometo de cetiltrimetilamónio, pureza 99% (Sigma-Aldrich);
- Gelatina A (Sigma-Aldrich);
- Gelatina B (Sigma-Aldrich);
- Genipina, pureza 98% (Chengdu King-tiger Pharm-chem. Tech. Co., Ltd);
- Borohidreto de Sódio, pureza 95% (Riedel-de Haën);
- Nitrato de Prata (José M.Vaz Pereira S.A.);
- PBS, solução tampão de fosfato salina pH 7.4 (Sigma-Aldrich)



## **2.2. Instrumentação**

### **2.2.1. Análise dinâmico mecânica (DMA)**

As análises de DMA realizaram-se segundo os procedimentos descritos na referência <sup>[31]</sup>, num equipamento DMA Tritec 2000 da Triton Technologies. Os ensaios realizaram-se do seguinte modo, através de amostras dos géis, preparam-se provetes que foram analisados em modo de compressão, aplicando-se uma deformação oscilatória com amplitude de 10  $\mu\text{m}$  e frequência de 1Hz, fazendo variar a força entre 0,01 a 0,4 N. Todos os ensaios realizaram-se à temperatura de 37°C.

### **2.2.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

Os termogramas para todas as amostras foram obtidos utilizando um DSC 50 Shimadzu, efectuando um aquecimento de 20 a 80°C a uma velocidade de 2°C/minuto.

### **2.2.3. Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)**

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotómetro de infravermelho FT Mattson 7000, com o acessório de ATR Golden Gate, para amostras sólidas. Os espectros foram registados com uma resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$  e com 256 varrimentos.

### **2.2.4. Espectroscopia de UV-Vis**

Para o caso das amostras de nanoesferas de ouro e os respectivos nanocompósitos, os espectros de absorção UV-Vis, registaram-se utilizando um espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-560 e também um espectrofotómetro UV-Vis Cintral 303. Os mesmos equipamentos utilizaram-se na análise das amostras de nanobastonetes de ouro *curtos* e os respectivos nanocompósitos.

Em todas as medições utilizou-se células de quartzo e como referência o solvente água destilada.

### **2.2.5. Espectroscopia de UV-Vis-NIR**

Relativamente às amostras de nanobastonetes de ouro *longos*, e os respectivos nanocompósitos, os espectros de absorção UV-Vis-NIR registaram-se utilizando um espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu. Em todas as medições utilizou-se células de quartzo, e como referência o solvente água destilada.

### **2.2.6. Potencial Zeta**

A determinação do potencial zeta dos coloides de nanoesferas e de nanobastonetes foram efectuadas num equipamento *Zeta Sizer Nano Series*, da Malvern Instruments. As medições realizaram-se utilizando uma célula de plástico descartável, após medição de pH.

### **2.2.7. Microscopia electrónica**

As nanoesferas de ouro foram analisadas por microscopia electrónica de transmissão (TEM) utilizando um microscópio Hitachi H-9000, operado a 300kV. Os nanobastonetes de ouro foram analisados por microscopia electrónica de varrimento em modo de transmissão (STEM) utilizando um microscópio Hitachi SU70 operado a 15kV. A preparação das amostras consistiu em depositar uma gota de colóide diluído, e bem lavado no caso dos nanobastonetes de ouro numa grelha de cobre revestida com carbono, deixando, posteriormente, evaporar o solvente. O solvente utilizado foi sempre água.

### 2.3. Síntese das nanoesferas de ouro

A síntese das nanoesferas de ouro realizou-se como descrito seguidamente. Num balão de 250ml aqueceu-se 95ml de água ultrapura até aos 80°C. De seguida adicionou-se 3,7 ml de ácido cloroáurico (III) trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 12,95mM. Por fim, aos 80°C adicionou-se 3,76ml de citrato de sódio, 96,8mM, e deixou-se 1h, a 80°C, sob agitação, sob refluxo.

Como resultado tem-se a redução dos iões  $\text{Au(III)}$  a ouro, pelo citrato, sob a forma de nanoesferas, cuja estabilização da solução coloidal é também promovida pelos iões citrato. Esta solução coloidal de ouro apresenta uma coloração vermelho-rosa.

### 2.4. Síntese dos nanobastonetes de ouro

A síntese dos nanobastonetes realizou-se seguindo o método de crescimento de sementes (*Seed-Mediated Growth*), descrito na referência <sup>[32]</sup>. Utilizando este método sintetizaram-se dois tipos de nanobastonetes, diferindo entre si na razão de aspecto, e consequentemente na localização da banda de plasmão longitudinal. Neste trabalho utilizar-se-á a designação de “curtos” e “longos”, para distinguir entre os dois tipos de nanobastonetes sintetizados. A síntese destes dois tipos de nanobastonetes tem em comum a necessidade de uma solução de “sementes”, a adicionar a uma solução de crescimento, onde irá ter lugar o crescimento dos nanobastonetes. A solução de “sementes” preparou-se como se descreve seguidamente. Misturou-se 5ml de CTAB 0,2M com ácido cloroáurico (III) trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5mM. A esta solução agitada adicionou-se 0,6ml de Borohidreto de sódio,  $\text{NaBH}_4$ , que resultou na formação de uma solução amarelo-acastanhada. Manteve-se a agitação durante 2 minutos. Após a agitação a solução foi mantida a uma temperatura de 25°C. <sup>[32]</sup>

A solução de crescimento, à qual se adicionam as sementes, difere consoante o tipo de nanobastonetes que pretende obter-se. <sup>[32]</sup>

#### Nanobastonetes *curtos*

Os nanobastonetes, aqui designados por nanobastonetes *curtos*, apresentam a banda de plasmão longitudinal, a aproximadamente 850nm. A solução de crescimento à qual se adicionaram as sementes preparou-se do seguinte modo. Adicionou-se 5ml de CTAB 0,2M

a 0,2ml de solução de  $\text{AgNO}_3$  (nitrato de prata) 0,0040M, a 25°C. A esta mistura adicionou-se 5ml de  $\text{HAuCl}_4$  0,0001M, e agitou-se esta suavemente. De seguida adicionou-se 70 $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico, um agente redutor suave, que faz com que a solução de crescimento mude da cor amarelo escuro para incolor.<sup>[32]</sup>

Por fim adicionou-se 12  $\mu\text{L}$  de solução de “sementes”, à solução de crescimento a uma temperatura entre os 27 e os 30°C. Nos 10 a 20 minutos seguintes obteve-se uma variação gradual da coloração da solução. A temperatura do meio crescimento manteve-se constante de 27 a 30°C em todos os procedimentos. Este método produz soluções puras de nanobastonetes com razões de aspecto até de 4,7.<sup>[32]</sup>

Após a síntese, os nanobastonetes foram centrifugados a 6000 rpm durante 1 hora e o sobrenadante substituído por água ultrapura. A solução resultante foi utilizada na preparação dos nanocompósitos.<sup>[32]</sup>

### **Nanobastonetes *longos***

Para a síntese de nanobastonetes mais compridos, na solução de crescimento utiliza-se uma mistura binária de surfactantes, constituída por BDAC e CTAB.<sup>[32]</sup>

Primeiramente preparou-se uma mistura de surfactantes adicionando 5ml de BDAC 0,15M, a 0,10g de CTAB. Após a dissolução da mistura por ultra-sons, esta solução foi adicionada a 200 $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  0,004M. De seguida, adicionou-se 5ml de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,001M, e após agitação suave da mistura, adicionou-se 70  $\mu\text{L}$  de 0,0778M de ácido ascórbico. Por fim, adicionou-se 12  $\mu\text{L}$  de solução de “sementes”. Após uma hora a razão de aspecto dos nanobastonetes deve estar entre 5 e 5,5, segundo <sup>[32]</sup>. Após 7 dias de envelhecimento, os nanobastonetes da solução coloidal cresceram, e segundo <sup>[32]</sup> deverão crescer para razões de aspecto entre 9 e 10. Os nanobastonetes preparados segundo este procedimento, apresentam a banda de superfície de plasmão longitudinal a comprimentos de onda superiores a 850 nm.<sup>[32]</sup>

Após a síntese dos nanobastonetes *longos* estes foram sujeitos a lavagem segundo o procedimento aplicado aos nanobastonetes *curtos*.

## 2.5. Preparação dos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano

Os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano foram preparados, utilizando como fase dispersa os três tipos de nanopartículas de ouro, previamente sintetizados (nanoesferas e nanobastonetes *curtos* e *longos*). Prepararam-se nanocompósitos com três teores distintos de fase dispersa, 60, 120 e 180 ppm, calculados em relação ao teor de polímero.

Os nanocompósitos com um teor de 60ppm de fase dispersa foram preparados de acordo com o procedimento descrito seguidamente. Num erlenmeyer pesou-se 0,5g de  $\kappa$ -carragenano. A este adicionou-se 12,5ml de água e deixou-se em agitação, a dissolver, num banho de água, com a temperatura entre os 80 e os 90°C, e tapado de modo a tentar minimizar as perdas de água.

Após a dissolução do  $\kappa$ -carragenano, adicionou-se 1,25ml de solução de nanopartículas. Seguidamente, após verificar-se que a solução estava misturada de forma homogénea, no meio reaccional, adicionou-se 1,25ml de KCl 1M.

Após a mistura destes componentes, transferiu-se 2,5ml deste preparado para porta amostras, tal que, após o arrefecimento, o nanocompósito adoptou a forma do porta amostras, a de um disco. Transferiu-se ainda uma pequena quantidade do preparado para uma cuvete de plástico. Esta cuvete serviu de molde para a posterior medição do espectro de UV-Vis ou UV-Vis-NIR dos nanocompósitos em cüvetes de quartzo.

Para a preparação dos nanocompósitos com um teor de fase dispersa de 120 e 180 ppm, procedeu-se previamente à concentração da solução de nanopartículas, por centrifugação. Mais concretamente partiu-se do volume de 2,50ml e 3,75ml, respectivamente, de solução coloidal de nanopartículas, centrifugaram-se e redispersaram-se em água ultrapura, num volume final de 1,25ml. Os nanocompósitos com maior teor em ouro, foram preparados seguindo o protocolo acima descrito para os nanocompósitos de 60ppm de teor em ouro, mas utilizando-se na sua preparação as soluções de 1,25ml concentradas.

Na preparação dos nanocompósitos para os estudos de libertação o procedimento utilizado foi o mesmo, adicionando-se apenas 1,25ml de azul de metileno, 0,3mg/ml, à preparação. Ajustou-se o volume de água a adicionar ao preparado, de modo à concentração dos reagentes não se alterar com a adição de azul de metileno.

## 2.6. Síntese dos nanocompósitos de gelatina

Os nanocompósitos de gelatina foram preparados utilizando, como fase dispersa, nanoesferas de ouro num teor de 60, 120 e 180 ppm. Estudou-se ainda o efeito do reticulante genipina. Para esse efeito foram preparados nanocompósitos com e sem genipina.

O procedimento geral, adoptado para a preparação dos nanocompósitos de gelatina teve em conta as referências<sup>[6, 7, 19]</sup>.

Num erlenmeyer, dissolveu-se, a 45°C, 2,25g de gelatina em água destilada. O procedimento descrito seguidamente realizou-se de modo a ter-se uma concentração de 15%(m/v) de gelatina no preparado, ou seja, o volume de água no qual se dissolve inicialmente a gelatina variou-se de forma a manter o volume total da mistura constante e as quantidades de reagente a adicionar, seguidamente, invariáveis.<sup>[6, 7, 19]</sup>

Após a dissolução da gelatina, adicionou-se 1,25, 2,50 e 3,75mL de coloide de Au para a síntese de nanocompósitos com o teor em ouro de 60, 120 e 180ppm, respectivamente.

Seguidamente à dispersão do coloide na mistura, adicionou-se 1,25ml de solução 0,3mg/ml de azul de metileno. Por fim adicionou-se 2,25 ml de solução aquosa de genipina 0,004g/ml. Estes três passos realizaram-se a 40°C, sob agitação, durante 30 minutos.<sup>[6, 7, 19]</sup>

No caso dos nanocompósitos para caracterização, o volume de solução de azul de metileno adicionado, é substituído por água destilada.

No final retirou-se 2,5ml do preparado para porta-amostras, de modo que, após o arrefecimento, esta adoptasse forma de discos.

## 2.7. Testes de sorção

De modo a verificar qual seria, efectivamente, o tipo de gelatina com melhor afinidade pelo composto utilizado como fármaco modelo, o azul de metileno, realizaram-se testes de sorção, tendo em conta o procedimento da referência<sup>[7]</sup>.

Liofilizaram-se dois blocos de gel de gelatina, um de tipo A e outro de tipo B, preparados conforme o método descrito em 2.6, mas sem nanopartículas, sem azul de metileno e contendo 1,125 ml de solução de genipina 0,004g/L.<sup>[7]</sup>

Deixaram-se os blocos a intumescer numa solução com a mesma força iónica que a solução de azul de metileno durante aproximadamente 12h a 37°C, para atingir-se o equilíbrio.<sup>[7]</sup>

Após este período de tempo, colocou-se o bloco de gel intumescido em 20ml de solução de azul de metileno com uma concentração 0,01mg/ml.<sup>[7]</sup>

Ao longo do tempo retirou-se sobrenadante e determinou-se a concentração de azul de metileno por espectroscopia UV-Vis.<sup>[7]</sup>

## 2.8. Ensaios de intumescimento

Realizaram-se ensaios de intumescimento a todas as amostras de nanocompósitos. Para cada ensaio procedeu-se do modo descrito seguidamente. Em copos graduados, colocou-se 50ml de PBS 0,01M e pH 7,4. Os copos de PBS foram tapados com parafilme e vidros de relógio e colocados no agitador orbital de modo a que o PBS atingisse 37°C.

Pesaram-se os discos de nanocompósito liofilizados e em cada copo colocou-se uma amostra.

Nos intervalos de tempo necessários, retiraram-se as amostras, limpou-se o excesso de PBS com papel de filtro, pesaram-se e voltaram a colocar-se nos copos. Este processo realizou-se até se verificar que o peso dos discos se mantinha constante.

## 2.9. Ensaios de libertação

Para os ensaios de libertação utilizou-se o azul de metileno (MB), como fármaco modelo. O azul de metileno é utilizado na indústria farmacêutica para diferentes posologias e foi seleccionado como fármaco modelo devido ao seu carácter de corante solúvel na água, cuja quantificação pode ser obtida facilmente por métodos espectroscópicos.

Os ensaios de libertação realizaram-se num agitador orbital KS 4000I Control da IKA a 37°C e 120 rpm.

Num copo contendo 50ml de PBS 0,01M a pH 7,4, introduziu-se um disco de nanocompósito liofilizado. Retiraram-se alíquotas de 1ml ao longo do tempo, que foram analisadas por espectroscopia UV-Vis para a quantificação do azul de metileno (comprimento de onda de 663nm). O volume de alíquota retirado foi repostado por volume equivalente de PBS fresco.

No caso dos carragenanos, para determinar a quantidade de MB libertado para cada tempo  $t$ , antes da análise UV-Vis, cada alíquota foi diluída com KCl 1M, com o rácio de 1:6, de modo a assegurar que o MB libertado não interagia com o carragenano.

A fracção de MB libertado no tempo  $t$  ( $m_t/m_0$ ) foi determinada através da equação 2.1.

$$\frac{m_t}{m_0} = \frac{50 \times C_n + \sum_{i=0}^{n-1} C_i}{m_0} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde  $m_t$  é a massa de MB no meio libertada até ao instante  $t$ , e  $m_0$ , é a massa original de MB no disco.  $C_i$  é a concentração mássica do MB (mg/ml) da alíquota e  $C_n$  é a concentração mássica do MB (mg/ml) da alíquota no instante  $t$  e  $n$  é o número total alíquotas extraídas até ao tempo  $t$ .





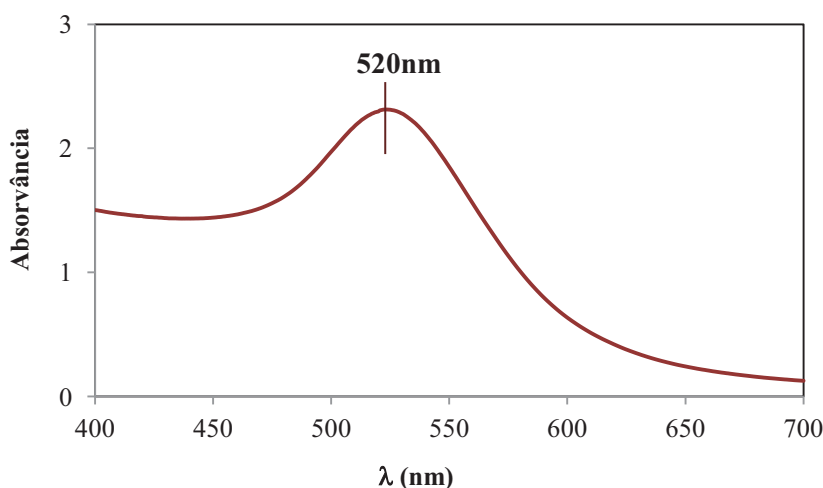
### 3. Resultados Experimentais e Discussão

#### 3.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

Após a síntese das nanopartículas de ouro, estas foram caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis e microscopia electrónica. A carga superficial das nanopartículas foi determinada por medidas de potencial zeta.

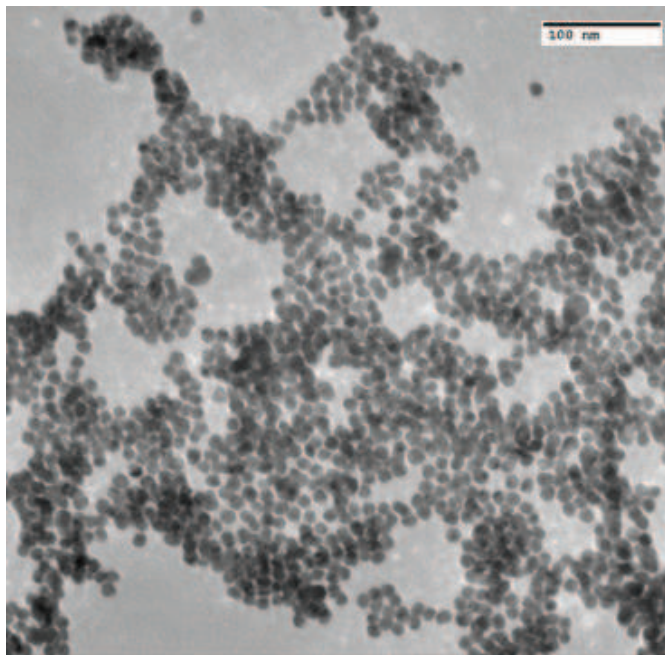
##### Nanoesferas

Na figura 3.1 apresenta-se o espectro de UV-Vis da solução coloidal de nanoesferas. A 520nm observa-se o pico característico do efeito de superfície de plasmão destas estruturas, o que confirma a presença de nanopartículas esféricas na solução coloidal.<sup>[28, 30]</sup>



**Figura 3.1** - Espectro óptico da solução coloidal de nanoesferas de ouro.

Por microscopia electrónica de transmissão, (TEM) foi possível confirmar a morfologia esférica das nanopartículas (figura 3.2). O diâmetro médio das nanoesferas, determinado a partir das imagens de microscopia, foi de  $10 \pm 2$  nm.

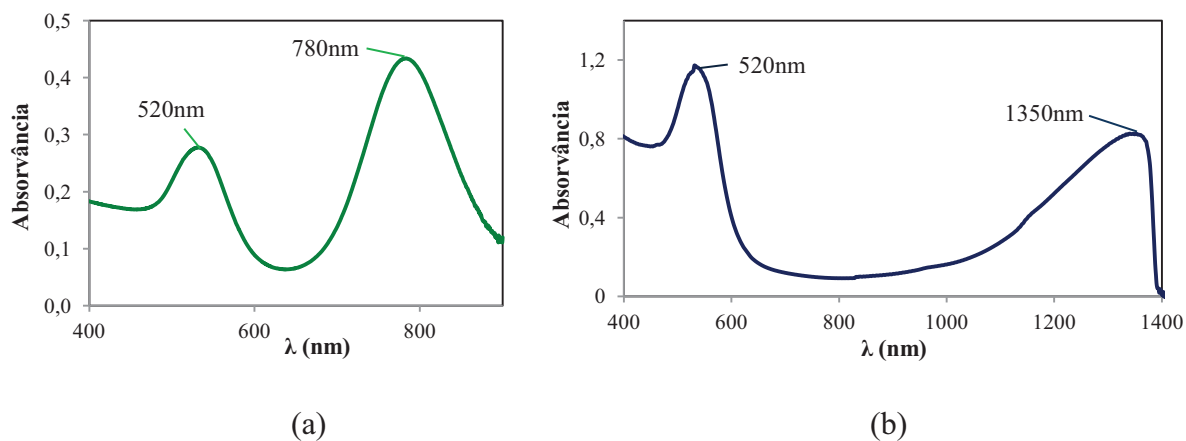


**Figura 3.2-** Imagem de TEM das nanoesferas de ouro com um diâmetro médio de 10 nm.

O potencial zeta da solução coloidal de nanoesferas foi de -30.0mV (pH 8.0). Foi ainda medido o potencial zeta da solução coloidal concentrada por centrifugação, não tendo sido observadas variações significativas. Este valor negativo de potencial zeta está relacionado com a presença do ião citrato à superfície das nanopartículas de ouro. O citrato funciona como agente estabilizante, evitando assim a aglomeração de nanopartículas.

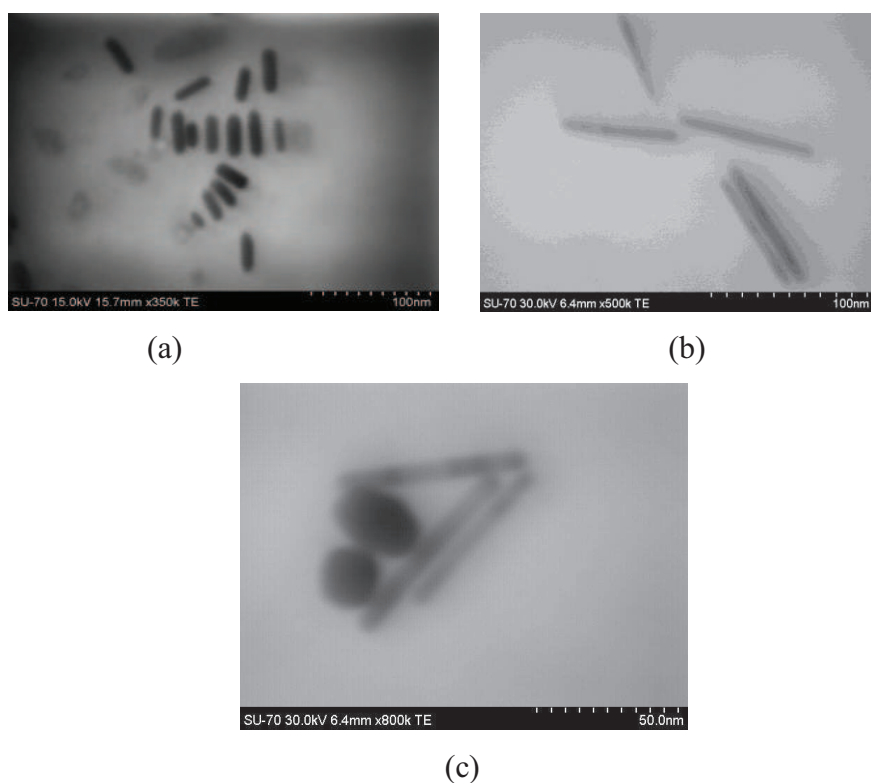
### **Nanobastonetes**

Na figura 3.3 podem observar-se os espectros UV-Vis das soluções de nanobastonetes de ouro *curtos* (figura 3.3a) e *longos* (figura 3.3b). Em ambos, pode observar-se a banda de plasmão transversal nos 520nm. Os nanobastonetes *curtos* apresentam a banda de plasmão longitudinal a 780nm, enquanto que para os nanobastonetes *longos* esta banda surge a 1350 nm.



**Figura 3.3** - Espectros ópticos dos nanobastonetes (a) *curtos* e (b) *longos*.

Uma pequena porção da solução coloidal foi posteriormente observada por microscopia electrónica de varrimento em modo de transmissão (STEM), obtendo-se assim algumas imagens dos nanobastonetes de ouro (figura 3.4).



**Figura 3.4**- Imagens de STEM de nanobastonetes de ouro (a) *curtos* e (b) (c) *longos*.

A partir das imagens de STEM, determinaram-se as dimensões médias dos nanobastonetes, utilizando o programa ImageJ e calculou-se a correspondente razão de aspecto. Os valores obtidos apresentam-se na tabela 3.1

**Tabela 3.1** - Dimensões e razão de aspecto dos nanobastonetes

Nanobastonetes	Comprimento (nm)	Largura (nm)	Razão de aspecto
<i>Curtos</i>	32±5	9±1	3,8±1
<i>Longos</i>	77±17	7±1	11.8±2

Verificou-se alguma dificuldade na reprodutibilidade do procedimento de síntese dos nanobastonetes *longos*, tendo-se verificado que a banda de plasmão longitudinal poderia localizar-se entre 1100 e 1350nm. Esta variação poderá estar relacionada com a etapa de crescimento, durante um período de 7 dias, ou com a lavagem menos eficiente dos nanobastonetes de ouro. Relativamente à primeira hipótese, esta variação poderá dever-se a oscilações nas condições do meio de crescimento, como na temperatura, enquanto que no segundo caso, poderá dever-se à presença de surfactante e de iões de ouro residual, em quantidade suficiente, para proporcionar o crescimento em mais alguns nanómetros dos nanobastonetes.

Devido a estas dificuldades, os nanocompósitos com nanobastonetes *longos* foram preparados utilizando nanobastonetes com razão de aspecto 11.8, excepto no caso dos estudos de libertação e análises de DMA, em que se utilizaram nanobastonetes *longos* com r.a. 10.8 e apresentando a banda de plasmão longitudinal centrada a 1200 nm.

Tal como descrito na secção 2.5, previamente à preparação dos nanocompósitos, as soluções de nanobastonetes foram centrifugadas de modo a duplicar e a triplicar a concentração inicial de nanopartículas, 0.05 mM, (esta concentração determinou-se tendo em conta a concentração de  $\text{HAuCl}_4$  e assumindo reacção completa, ou seja é um valor aproximado e de referência).

O potencial zeta das várias soluções de nanobastonetes foi medido de modo a avaliar a carga superficial das nanopartículas. Os resultados obtidos encontram-se indicados na tabela 3.2.

**Tabela 3.2-** Valores de potencial zeta das soluções coloidais de nanobastonetes para diferentes concentrações de nanopartículas

Amostra   Concentração de Au	pH (25°C) antes da medição de Potencial Zeta	Potencial Zeta (mV)
Nanobastonetes <i>curtos</i>   (0,05mM)	5,2	43,5
Nanobastonetes <i>curtos</i>   (0,1mM)	6,2	43,3
Nanobastonetes <i>curtos</i>   (0,15mM)	6,0	42,9
Nanobastonetes <i>longos</i>   (0,05mM)	4,2	64,9
Nanobastonetes <i>longos</i>   (0,1mM)	4,3	77,0
Nanobastonetes <i>longos</i>   (0,15mM)	4,0	70,1

Os resultados obtidos de potencial zeta para os nanobastonetes dos dois tamanhos e diferentes concentrações são positivos. Estes resultados estão relacionados com a estabilização dos nanobastonetes de ouro através de surfactantes catiónicos. Estes surfactantes encontram-se dispostos à superfície dos nanobastonetes, na forma de uma bicamada, que é responsável pela estabilidade da mistura coloidal e que permanece após a lavagem do excesso de surfactante.<sup>[27, 33]</sup>

Estes resultados demonstram ainda que apesar do aumento de concentração, o potencial zeta não apresenta variações significativas.

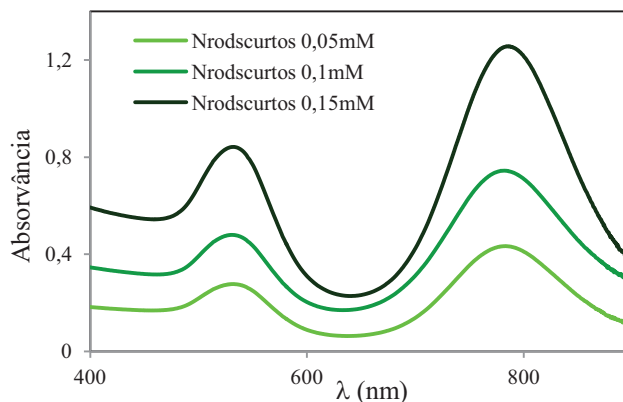
Verificou-se que os nanobastonetes *longos* apresentavam uma carga maior relativamente aos nanobastonetes *curtos*. Isto pode estar relacionado com o tipo de composto que se encontra a estabilizar as nanopartículas.

No caso do nanobastonetes *curtos*, as nanopartículas são estabilizadas por CTAB, já no caso dos nanobastonetes *longos*, estes encontram-se estabilizados por dois surfactantes o CTAB e o BDAC. Esta diferença relativamente às moléculas responsáveis pela estabilização das nanopartículas pode estar relacionada com esta diferença de potencial zeta entre o nanobastonetes *curtos* e os *longos*.

Posteriormente à preparação dos nanocompósitos, obtiveram-se os espectros UV-Vis das soluções coloidais com concentração diferentes, concentradas a partir da solução inicial de nanobastonetes, por centrifugação.

Procedeu-se assim, de modo a verificar se haveria alguma variação dos picos característicos do efeito de superfície de plasmão, com a concentração. Isto pois, ao concentrar-se a solução coloidal por centrifugação, poderia verificar-se alterações inerentes a uma possível aglomeração das nanopartículas. No entanto isso não se verificou e,

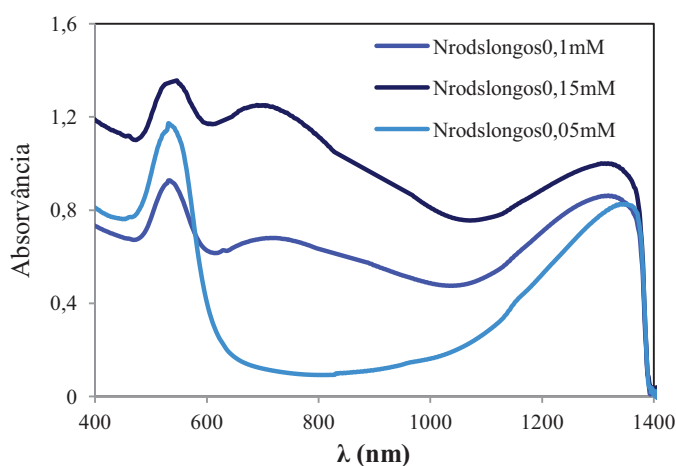
portanto, obtiveram-se três soluções coloidais estáveis com três diferentes concentrações, com os picos de absorção da banda de plasmão localizados no mesmo comprimento de onda. Veja-se a figura 3.5.



**Figura 3.5-** Espectros das soluções de nanobastonetes *curtos*, com razão de aspecto 3.8.

As soluções coloidais caracterizadas utilizaram-se de seguida na preparação dos nanocompósitos, que se encontram caracterizados em seguida.

À semelhança do que se fez para os nanobastonetes *curtos*, antes da preparação dos nanocompósitos com nanobastonetes de ouro *longos*, obtiveram-se os espectros das soluções coloidais, relativas às três concentrações diferentes de nanobastonetes de ouro, obtidas também por concentração da solução inicial, através de centrifugação. Atente-se à figura 3.6.



**Figura 3.6 -** Espectros das soluções de nanobastonetes com razão de aspecto de 11,8.

Ao comparar-se os espectros de UV-Vis da solução inicial, com os espectros das soluções concentradas duas e três vezes, verifica-se o aparecimento de um pequeno ombro a 700nm, e uma diminuição na intensidade da banda de 520nm. Isto pode estar relacionado com a existência de aglomeração longitudinal de nanopartículas pequenas, esferóides, resultando assim na diminuição da banda de 520nm característica destas e no aparecimento de uma banda a 720nm, banda de plasmão longitudinal derivada das estruturas resultantes da aglomeração longitudinal. A presença destas estruturas esferóides na solução de nanobastonetes verificou-se por imagens de STEM, como se pode ver pela figura 3.4 c).<sup>[33]</sup>

### 3.2. Hidrogéis nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano

#### 3.2.1. Propriedades ópticas

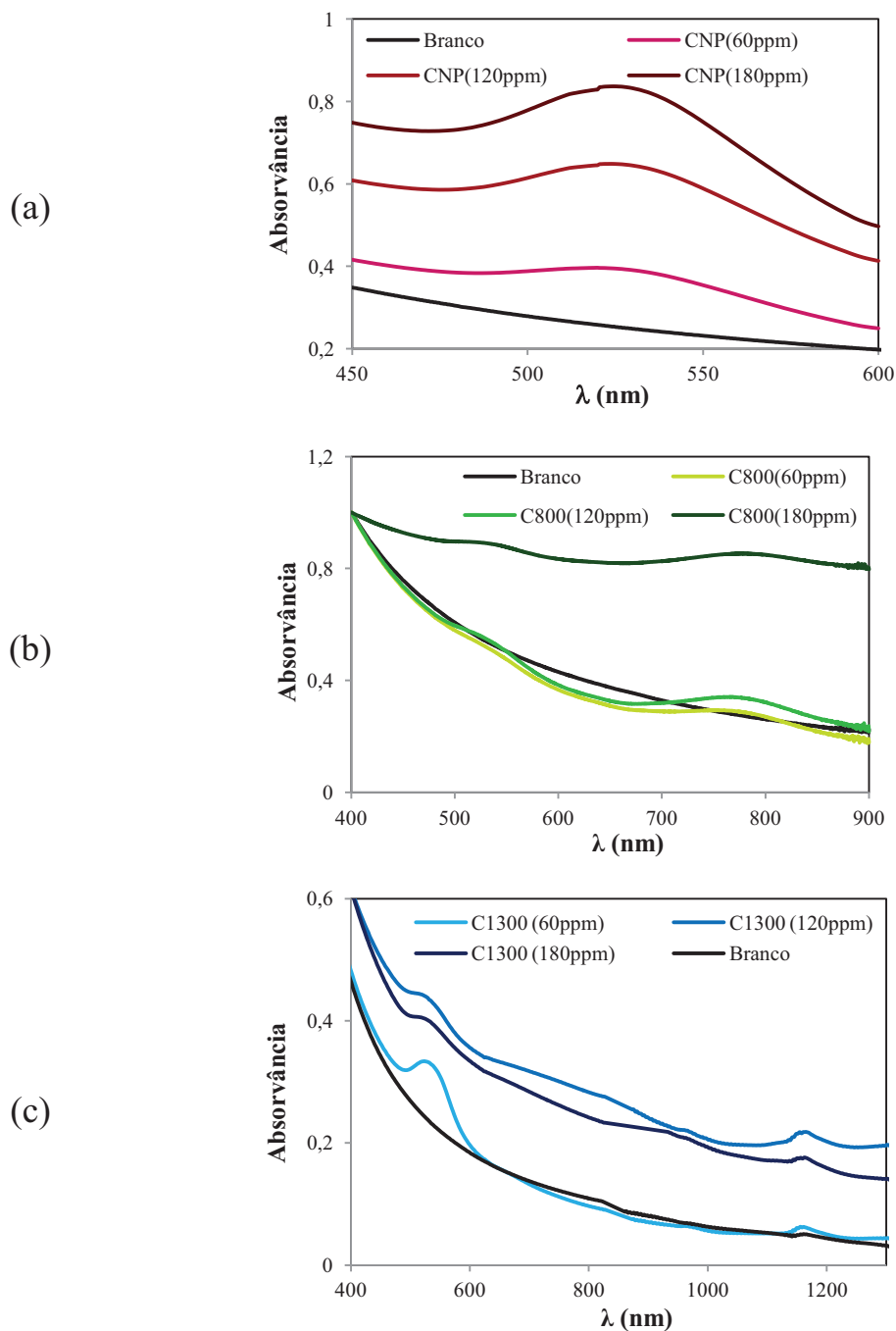
Com o intuito de averiguar, se os nanocompósitos preparados teriam adquirido ou não, as características ópticas das nanopartículas como era desejado, obtiveram-se os espectros de UV-Vis destes. Os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanoesferas de ouro são denominados nos gráficos por CNP(x), os com nanobastonetes *curtos* por C800(x) e finalmente os com nanobastonetes *longos* por C1300(x), sendo o valor de x o teor de ouro, em ppm, no nanocompósito, calculado relativamente à massa de polímero.

Tendo em conta os nanocompósitos com nanoesferas de ouro, estes apresentaram o mesmo pico de absorção, correspondente à banda de plasmão das nanoesferas de ouro, centrado a 520nm, veja-se a figura 3.7 a).

Verificou-se ainda que, os espectros ópticos dos nanocompósitos preparados com nanobastonetes, apresentavam dois picos de absorção correspondentes às bandas de plasmão transversal e longitudinal dos nanobastonetes. A banda de plasmão transversal dos nanocompósitos não sofreu desvio em relação à observada nos nanobastonetes, surgindo centrada a 520 nm. O mesmo sucedeu com a banda de plasmão longitudinal, dos nanocompósitos preparados com nanobastonetes *curtos* que apareceu centrada a 800 nm, tal como nas soluções coloidais de nanobastonetes, observe-se a figura 3.7 b). No entanto no caso dos nanocompósitos contendo nanobastonetes *longos*, observou-se um desvio da banda de plasmão longitudinal de 1350 nm para 1150 nm, figura 3.7 c). O desvio foi idêntico, independentemente do teor de fase dispersa dos nanocompósitos. Este desvio pode ter-se verificado, devido a interações das nanopartículas com o polímero, ou a



alterações na morfologia dos nanobastonetes provocadas por efeitos da temperatura durante a preparação do nanocompósitos. [34]

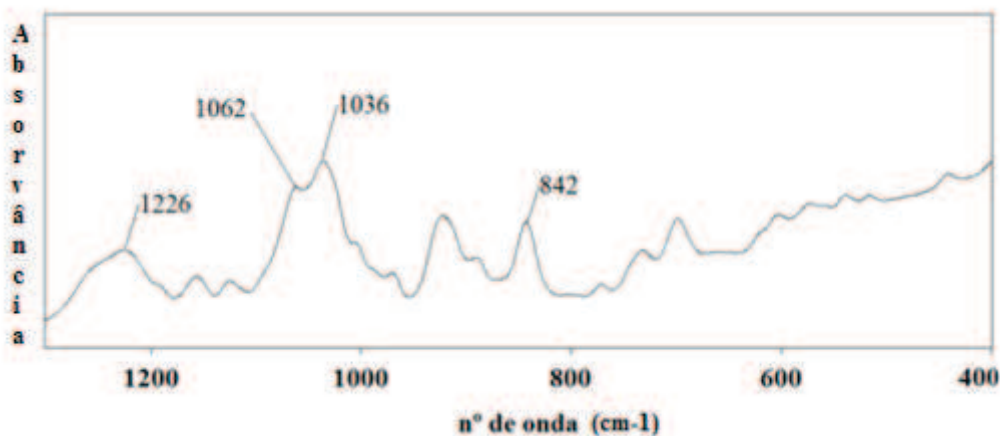


**Figura 3.7**-Espectros ópticos dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano contendo como fase dispersa (a) nanoesferas de ouro, (b) nanobastonetes *curtos* e (c) nanobastonetes longos. Em (b), os dados representados encontram-se normalizados tendo em conta os valores de absorvância de 400nm.

### 3.2.2. Estrutura química

Os nanocompósitos liofilizados foram analisados por espectroscopia de infravermelho, com o objectivo de verificar se existiriam diferenças significativas relativamente às propriedades do polímero.

Na figura 3.8 apresenta-se o espectro de infravermelho do polímero,  $\kappa$ -carragenano. O pico que surge a  $1226\text{cm}^{-1}$  corresponde à banda da vibração de elongação assimétrica da ligação S-O, característico dos grupos sulfato do carragenano. A  $1036\text{cm}^{-1}$  e  $1062\text{cm}^{-1}$  identificam-se as bandas correspondentes à vibração das ligações C-O e C-OH, respectivamente. Por fim, observa-se ainda o pico entre  $842\text{cm}^{-1}$  referente à vibração de elongação da ligação C-O-S da  $\alpha(1-3)$ -D-galactose do  $\kappa$ -carragenano.<sup>[35]</sup>

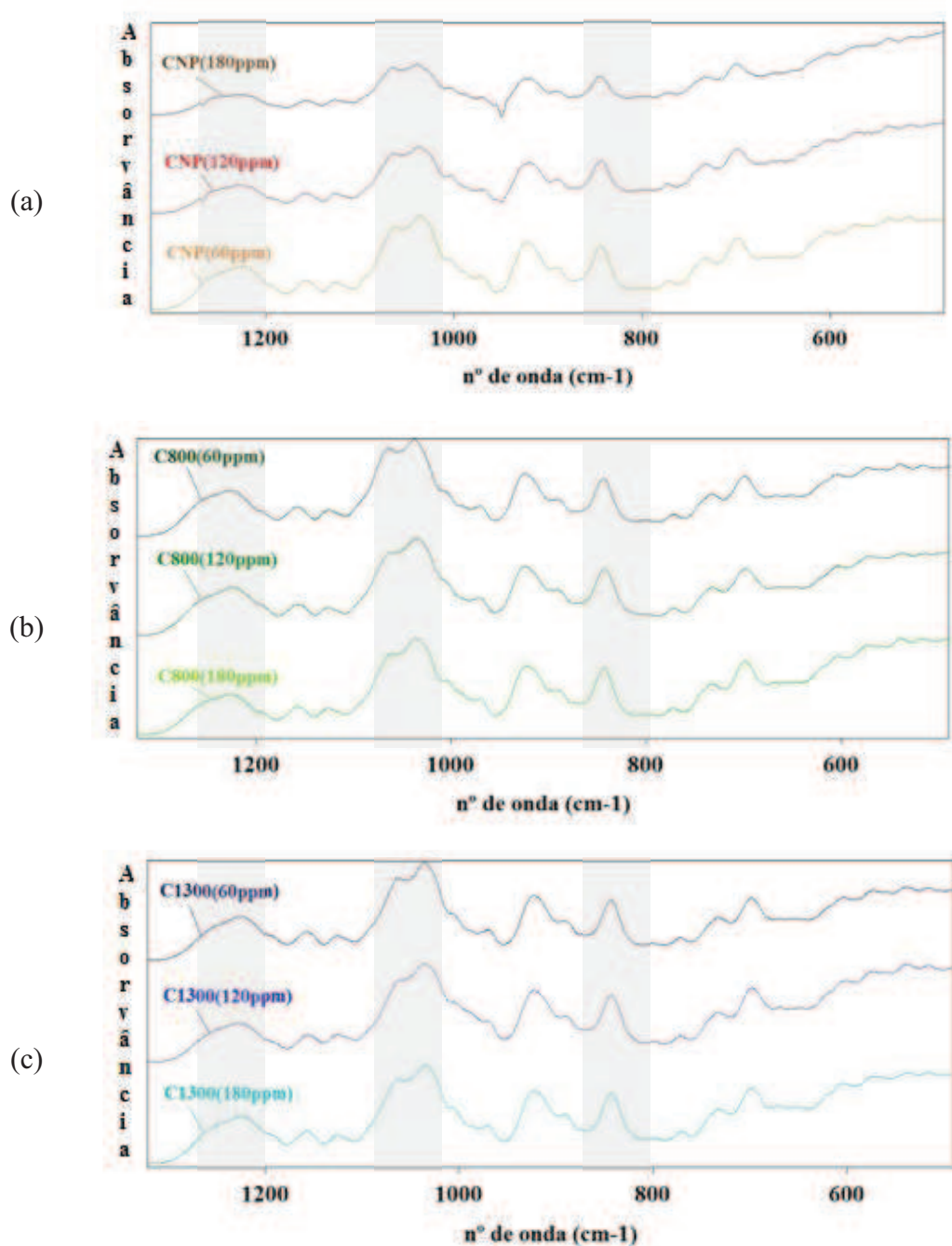


**Figura 3.8-** Espectro de infravermelho, em modo de absorvância, do  $\kappa$ -carragenano.

Na figura 3.9a, encontram-se representados os espectros de infravermelhos dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanoesferas de ouro, CNP(x), com teores em ouro, x, de 60, 120 e 180ppm. Não se observaram variações significativas do espectro dos nanocompósitos, relativamente ao branco (polímero sozinho). O mesmo aconteceu com o aumento do teor de ouro nos nanocompósitos.

A figura 3.9 b) apresentam-se os espectros de infravermelho dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com os nanobastonetes *curtos*. Como pode observar-se, não se verificaram alterações visíveis no espectro, comparativamente ao espectro do  $\kappa$ -carragenano. Não se observaram alterações relevantes no espectro (aparecimento de novas bandas ou desvio das existentes) que resultassem da presença de CTAB nos

nanocompósito (CTAB residual proveniente da solução de nanobastonetes), ou da sua interacção com o polímero. O aumento da concentração de nanobastonetes no nanocompósito, também não resultou em alterações significativas do espectro do  $\kappa$ -carragenano.



**Figura 3.9-** Espectros de infravermelho, em modo de absorvância, dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano liofilizados contendo como fase dispersa (a) nanoesferas de ouro, (b) nanobastonetes *curtos* e (c) nanobastonetes *longos*.

À semelhança do que se fez com os nanocompósitos com nanobastonetes *curtos*, também se analisaram os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanobastonetes *longos* através de FT-IR (Figura 3.9 c). Verificou-se que, também, tal como para os nanocompósitos com nanobastonetes *curtos*, nestes também não se observavam variações no espectro de infravermelho, comparativamente ao espectro do polímero sozinho. Igualmente não se verificaram alterações relevantes no espectro, resultantes da presença de CTAB ou de BDAC nos nanocompósito (CTAB e BDAC residual, proveniente da solução coloidal de nanobastonetes).

### 3.2.3. Propriedades térmicas e mecânicas

Com o intuito de estudar a influência das nanopartículas nas propriedades térmicas do polímero analisaram-se os nanocompósitos por DSC.

Em geral, os termogramas de hidrogéis caracterizam-se por apresentar um pico endotérmico, que corresponde à absorção de calor por parte destes para efectuar a transição de gel para sol. A temperatura de fusão do gel ( $T_f$ ) foi definida como a temperatura do pico.

Verificou-se que a temperatura de fusão do  $\kappa$ -carragenano sozinho é de 49°C e que, de um modo geral, aumenta com a incorporação de nanopartículas e com o aumento do teor de fase dispersa. No caso das nanoesferas observa-se um aumento de 49°C para 71°C, para um teor de nanoesferas de 60 ppm. O aumento da concentração para 120 ppm não resulta em alterações significativas de  $T_f$  e aumentando para 180 ppm observa-se uma ligeira diminuição de  $T_f$  para 67°C. No caso dos compósitos contendo nanobastonetes verifica-se que  $T_f$  aumenta para 55°C e 57°C, quando se adiciona nanobastonetes *curtos* e *longos*, respectivamente, num teor de 60 ppm. Aumentando a concentração para 120 ppm leva a um aumento de  $T_f$  para 62°C em ambos os sistemas. O aumento do teor de nanobastonetes para 180 ppm não afecta significativamente  $T_f$  no caso dos bastonetes *curtos* e diminui ligeiramente  $T_f$  de 62°C para 59°C nos compósitos com bastonetes longos.

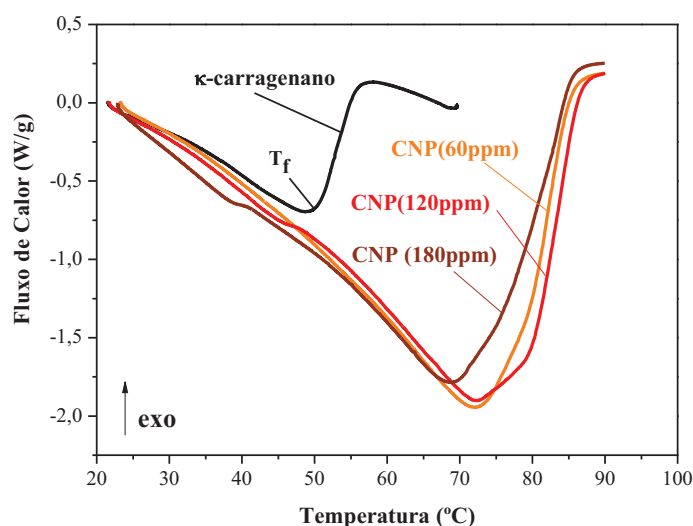
Este aumento da temperatura de fusão, com a adição de nanopartículas, pode estar relacionado com o aumento da estabilidade da rede polimérica, proporcionada pelas nanopartículas, evitando assim a fusão do gel a uma temperatura mais baixa.

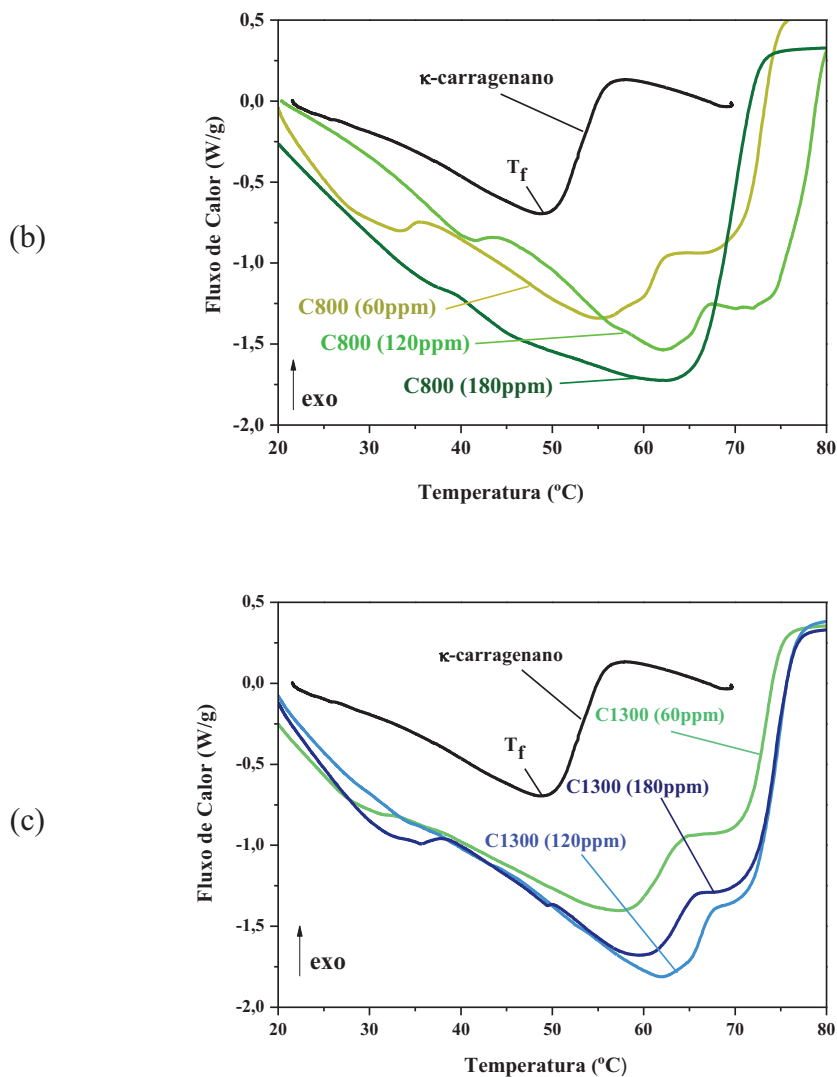
Esta maior estabilidade na rede polimérica pode estar relacionada com um efeito de reforço da rede polimérica por parte das nanopartículas, que podem estar aqui a funcionar como alicerces auxiliares desta, retardando o colapso do gel.

Observou-se ainda que os termogramas dos nanocompósitos apresentavam picos mais largos que o do  $\kappa$ -carragenano, sendo possível observar também o aparecimento de alguns ombros, em particular nos nanocompósitos preparados com nanobastonetes. Estes resultados sugerem que a presença dos nanobastonetes na rede polimérica do  $\kappa$ -carragenano, confere alguma heterogeneidade ao sistema, o que pode explicar a irregularidade presente nos termogramas. Por outras palavras é possível que na presença de nanobastonetes se formem agregados de cadeias poliméricas com diferentes dimensões, envolvendo por exemplo hélices duplas mais afastadas e que estes agregados fundam a temperaturas diferentes, levando ao aparecimento de ombros na curva do termograma.<sup>[36]</sup>

No caso dos nanocompósitos contendo nanobastonetes *longos* não se verificou um aumento linear da temperatura de fusão, com o aumento do teor de ouro nos nanocompósitos. O nanocompósito com teor em ouro de 180ppm (C800(180ppm)) apresenta uma curva de DSC situada entre as curvas de nanocompósitos de 60ppm e 120ppm. Esta diferença poderá ser explicada através da possível heterogeneidade na distribuição de nanobastonetes no gel.

(a)





**Figura 3.10** – Representação dos termogramas de DSC para os géis de  $\kappa$ -carragenano, respectivos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano contendo como fase dispersa (a) nanoesferas de ouro, (b) nanobastonetes *curtos* e (c) nanobastonetes *longos*.

De modo a melhor compreender as propriedades mecânicas dos nanocompósitos de carragenano com nanobastonetes de ouro, realizaram-se análises de DMA. Estas análises realizaram-se segundo o método de sugerido pela referência <sup>[31]</sup>, segundo as condições descritas na secção 2.2.1.

Através dos dados obtidos, para cada ensaio efectuaram-se representações gráficas do módulo em função da força estática, ajustando-se os pontos obtidos a uma recta de tendência. Para força estática zero, extrapolou-se o respectivo valor do módulo elástico, de modo a poder comparar-se os valores diferentes valores de  $E'$  para os diferentes

nanocompósitos. Seguiu-se esta metodologia, devido à aplicação de diferentes valores de força, como sugerido por [31].

Os valores obtidos para  $E'$ , para força estática nula são apresentados na tabela 3.3.

**Tabela 3.3-** Módulo elástico médio ( $E'$ ) e respectivo desvio padrão dos géis de k-carragenano, e géis nanocompósitos determinados a partir de DMA.

	Branco		
E' (kPa)	156,21±8,9		
Nanoesferas	CNP(60ppm)	CNP(120ppm)	CNP(180ppm)
E' (kPa)	191,8±12,1	255,58±55,4	167,67±48,6
Nanobastonetes <i>curtos</i>	C800(60ppm)	C800(120ppm)	C800(180ppm)
E' (kPa)	182,2±33,7	174,5±32,3	208±19,9
Nanobastonetes <i>longos</i>	C1300(60ppm)	C1300(120ppm)	C1300(180ppm)
E' (kPa)	226,3±5,1	228,1±5,7	260,95±21,3

De um modo geral verifica-se que o módulo elástico dos géis nanocompósitos é superior ao do  $\kappa$ -carragenano sozinho (branco).

Isto pode estar relacionado com a hipótese já referida, anteriormente, sobre a actuação das nanopartículas junto da rede polimérica como estruturas de reforço. O aumento do módulo elástico é mais pronunciado no caso dos compósitos com nanobastonetes *longos*. Neste caso também é visível o aumento do módulo, com o aumento do teor de nanobastonetes *longos*. No entanto, neste caso terá mais expressão, provavelmente, devido ao facto de como os nanobastonetes serem mais compridos, podendo promover de modo mais eficiente o reforço da estrutura do que no caso dos nanobastonetes *curtos*.

### 3.2.4. Intumescimento

Realizaram-se ensaios de intumescimento com o objectivo de estudar o efeito na capacidade de absorção de água, por parte do polímero, com a presença das nanopartículas de ouro na sua rede. Estes estudos são deveras importantes, uma vez que a libertação de um dado princípio activo, que se encontre aprisionado na rede polimérica do hidrogel, é influenciada pelo seu intumescimento.

Na figura 3.11 estão representadas as curvas de intumescimento, obtidas a partir destes ensaios, para nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanoesferas de ouro, CNP(x), nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanobastonetes *curtos*, C800(x) e nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com nanobastonetes *longos*, C1300(x). Isto para diferentes teores em ouro nos nanocompósitos, x, nomeadamente 60, 80 e 120ppm, relativamente à massa de polímero.

Analisando o gráfico a) da figura 3.11, observa-se que a curva de intumescimento dos nanocompósitos com um teor em nanoesferas de 60ppm, situa-se acima da do branco, indicando portanto que a velocidade de intumescimento deste nanocompósito é superior à do  $\kappa$ -carragenano, apresentando também um valor de razão de intumescimento no equilíbrio superior, ao do branco. Os nanocompósitos com teores de nanoesferas de ouro de 120ppm e 180ppm apresentam também uma razão de intumescimento no equilíbrio superior à do branco, apesar de inferior à do nanocompósito com 60 ppm. A velocidade de intumescimento destes nanocompósitos é menor que a do  $\kappa$ -carragenano.

Com base nos resultados das propriedades mecânicas, dado que os géis nanocompósitos têm um módulo elástico superior ao do  $\kappa$ -carragenano, seria de esperar que oferecessem mais resistência à entrada de moléculas de água e apresentassem valores de intumescimento no equilíbrio inferiores ao do polímero sozinho. O comportamento observado pode estar relacionado com o efeito da carga superficial das nanopartículas. As nanoesferas de ouro têm uma carga superficial, como se pode verificar através de medições de potencial zeta. Esta carga superficial origina um gradiente de diferença de cargas, entre o nanocompósito e o meio que o rodeia. Este gradiente de cargas, juntamente com o gradiente de concentração (devido à falta de água no seio do nanocompósito relativamente ao meio que o rodeia), vai resultar numa maior pressão osmótica no nanocompósito e num maior fluxo de água para o seio do nanocompósito como forma de equilibrar a pressão osmótica, comparativamente ao fluxo de água para o seio do polímero sozinho.

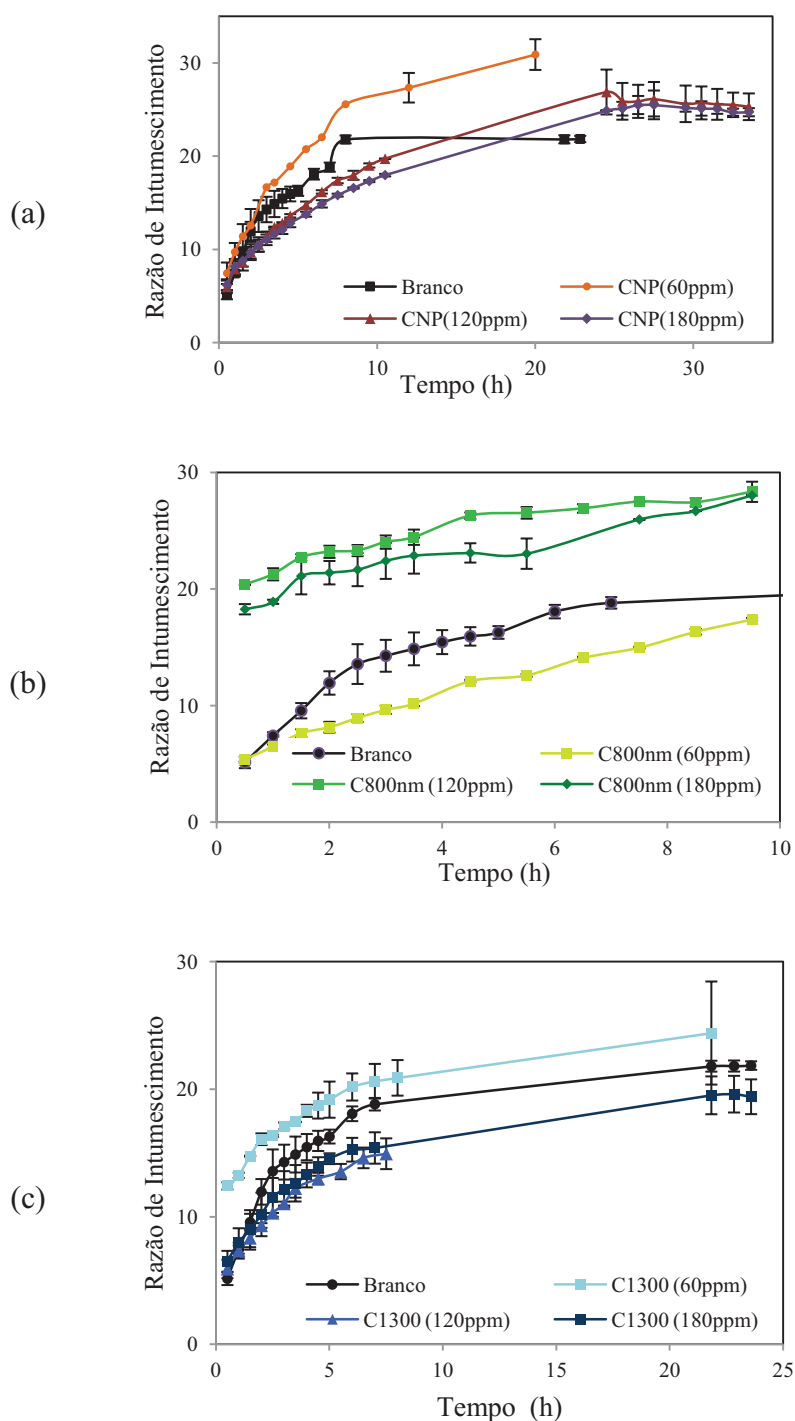
O aumento da concentração de nanopartículas de ouro no nanocompósito resulta no aumento da carga no nanocompósitos. Isto pode resultar num maior fluxo de água para o seio do nanocompósito, chegando-se ao equilíbrio do intumescimento. No entanto no caso das nanoesferas verificou-se que uma maior concentração de fase dispersa (120 e 180 ppm) conduz a uma menor velocidade de intumescimento e menor intumescimento no equilíbrio do que para um teor 60 ppm. Uma possível explicação seria o efeito de reforço da matriz



polimérica, para maiores concentrações de fase dispersa. Este efeito conduziria à formação de um gel mais forte, que ofereceria maior resistência ao fenómeno de intumescimento. No entanto os valores de módulo elástico dos nanocompósitos com nanoesferas não permitiram corroborar esta explicação.

Analizando agora os resultados relativos aos nanocompósitos com nanobastonetes *curtos*, figura 3.11 b), verificou-se que os nanocompósitos com um teor em ouro de 60 ppm, atingem uma razão de intumescimento de equilíbrio similar à do branco,  $\kappa$ -carragenano, enquanto que os nanocompósitos de 120 e 180ppm apresentam razões de intumescimento de equilíbrio bastante superiores ao branco. Verificou-se ainda que, estes dois últimos não apresentavam diferenças muito significativas no seu comportamento, ao longo do ensaio de intumescimento. Estes resultados apontam para o efeito da variação da pressão osmótica, devido ao aumento de carga no nanocompósito. No caso dos nanobastonetes *curtos* esta carga é facultada por moléculas de surfactante de carga positiva, CTAB, distribuídas à superfície das nanopartículas. De notar que todas as formulações contendo nanobastonetes *curtos* atingiram o intumescimento de equilíbrio, a tempos mais curtos que os restantes nanocompósitos.

Já no caso dos nanocompósitos com nanobastonetes *longos*, figura 3.11 c), verificou-se um comportamento semelhante ao dos nanocompósitos com nanoesferas. Para teor de 60ppm, observa-se uma razão de intumescimento de equilíbrio superior à do branco e dos nanocompósitos com nanobastonetes *curtos* o que pode dever-se à carga superficial (potencial zeta) mais elevada dos nanobastonetes *longos*. No entanto o mesmo já não aconteceu com os nanocompósitos com um teor em ouro de 120ppm e 180ppm. Nestes o intumescimento é mais lento e o intumescimento no equilíbrio é menor que o do polímero sozinho. No caso do nanocompósito de 180 ppm tal poderia ser explicado pelo elevado módulo elástico. No entanto as propriedades mecânicas não permitem explicar o baixo intumescimento do nanocompósito 120 ppm, o que sugere que possam haver outros factores a afectar o intumescimento destes géis.

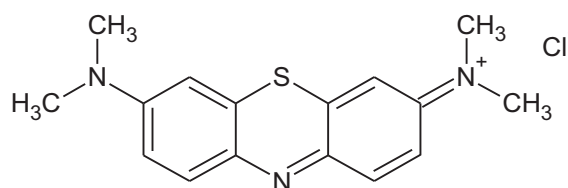


**Figura 3.11** – Razão de intumescimento em função do tempo dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano contendo com fase dispersa (a) nanoesferas de ouro, (b) nanobastonetes *curtos* e (c) nanobastonetes *longos*. As linhas que unem os pontos experimentais foram colocadas para poder ter-se melhor percepção da curva de intumescimento de cada nanocompósitos.

### 3.3. Hidrogéis nanocompósitos de gelatina

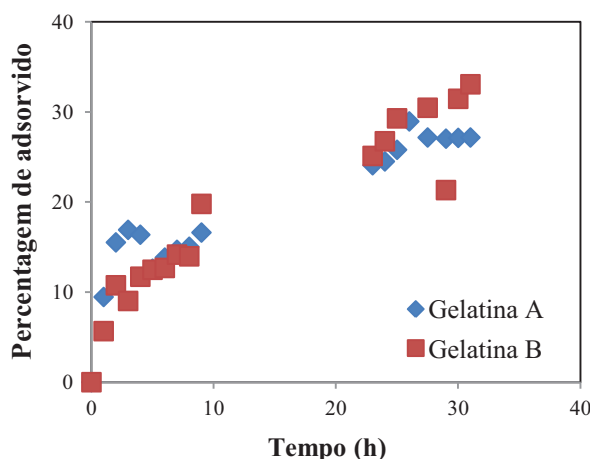
#### 3.3.1. Selecção do tipo de gelatina

O ponto isoeléctrico (IEP) da gelatina é algo de muito relevante quando se trata de sistemas de libertação de fármacos. Se a gelatina não tiver afinidade com o fármaco, este é libertado todo de uma só vez mas se a gelatina tiver afinidade com o fármaco este vai sendo libertado gradualmente. Gelatinas carregadas negativamente têm afinidade com princípios activos carregados positivamente, gelatinas carregadas negativamente têm afinidade com princípio activos carregados positivamente. O azul-de-metileno, fármaco modelo utilizado, é um composto catiónico (figura 3.12), pelo que é de esperar que apresente mais afinidade com a gelatina do tipo B, uma vez que esta trata-se de gelatina carregada negativamente. [7, 8, 13, 37, 38]



**Figura 3.12-** Representação da estrutura molecular do azul-de-metileno

Para avaliar a afinidade entre o azul-de-metileno e a gelatina, realizaram-se ensaios de sorção. No entanto, como pode verificar-se no gráfico de percentagem de adsorção de azul-de-metileno pelos dois tipos de gelatina (figura 3.13), não se verificam diferenças significativas na adsorção de azul-de-metileno por parte dos dois tipos de gelatina, gelatina A (ácida) e gelatina B (básica).

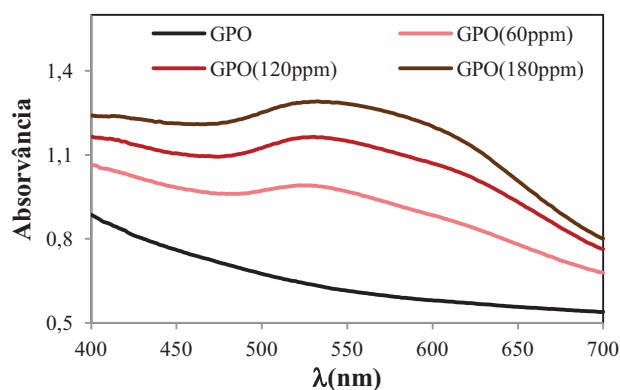


**Figura 3.13-** Representação gráfica da percentagem de azul de metileno adsorvido, em função do tempo, nas gelatinas do tipo A e B, reticuladas.

Tendo em conta esta diferença pouco significativa entre gelatinas, seleccionou-se a gelatina tipo A para a preparação dos compósitos. Isto porque, durante os ensaios de sorção, esta demonstrou um comportamento mais estável a nível da estrutura, do que a gelatina B, a sua estrutura revelou-se mais resistente à dissolução.

### 3.3.2. Propriedades ópticas

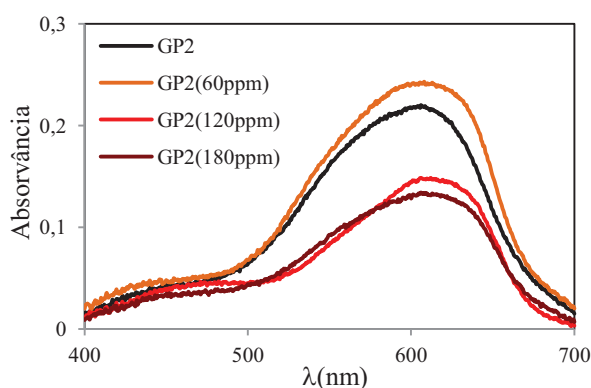
Na figura 3.14 apresentam-se os espectros de UV-Vis dos nanocompósitos de gelatina, sem reticulante, contendo nanoesferas de ouro com teores em ouro de 60, 120 e 180 ppm. Os espectros dos nanocompósitos apresentam a banda característica do efeito de plasmão relativo às nanoesferas de ouro a 520nm.



**Figura 3.14** – Espectros de UV-VIS dos nanocompósitos de gelatina, sem reticulação, com nanopartículas de ouro.

Ainda relativamente aos mesmos espectros, observou-se para todos os nanocompósitos o aparecimento de um ombro a cerca de 600nm, que se torna mais evidente à medida que se aumenta a concentração de nanopartículas de ouro. Estes resultados podem indicar alguma aglomeração das nanopartículas.

Os nanocompósitos de gelatina reticulada foram igualmente analisados por espectroscopia UV-Vis. No entanto não se conseguiu observar de modo nítido a contribuição da banda de plasmão das nanoesferas (figura 3.15). Isto está relacionado com o facto de a gelatina, ao ser reticulada com genipina, sofrer uma alteração da sua cor de transparente para azul-escuro. Consequentemente, o seu espectro óptico apresenta uma banda larga centrada a 600nm que se sobrepõe parcialmente à banda do plasmão das nanoesferas.



**Figura 3.15** - Espectros de UV-VIS dos nanocompósitos de gelatina e nanoesferas de ouro, reticulados com genipina.

### 3.3.3. Estrutura Química

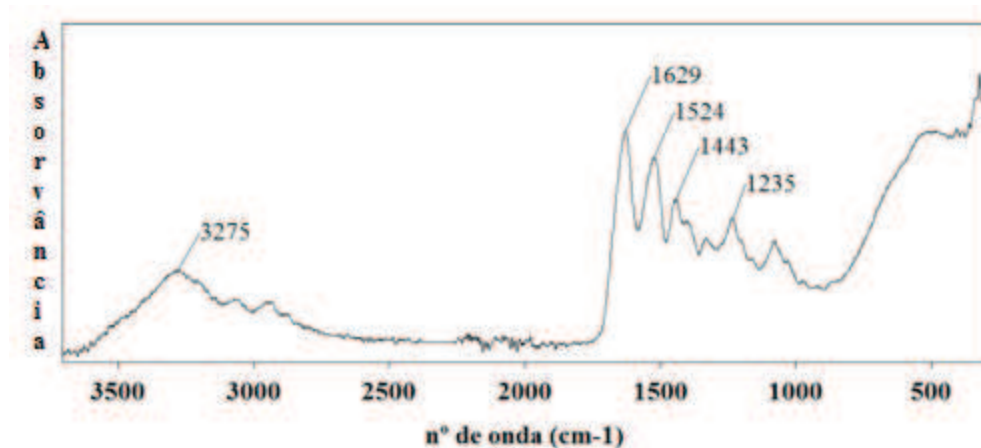
O efeito da reticulação com genipina, e da incorporação das nanoesferas de ouro na estrutura química da gelatina foi investigado por espectroscopia de infravermelho. Na figura 3.16 mostra-se o espectro de infravermelho da gelatina A.

A banda que surge na região  $3290\text{--}3280\text{cm}^{-1}$  deve-se à vibração de alongação da ligação N-H dos grupos amida, ligados através de pontes de hidrogénio. <sup>[39]</sup>

A  $1629\text{cm}^{-1}$  observa-se a banda amida I, que corresponde à vibração de alongação do grupo carbonilo C=O, à vibração de deformação angular da ligação N-H e ainda à vibração de alongação da ligação C-N. <sup>[39]</sup>

A banda da amida II verifica-se a  $1524\text{cm}^{-1}$ . Esta banda está relacionada com a deformação das ligações N-H. <sup>[39]</sup>

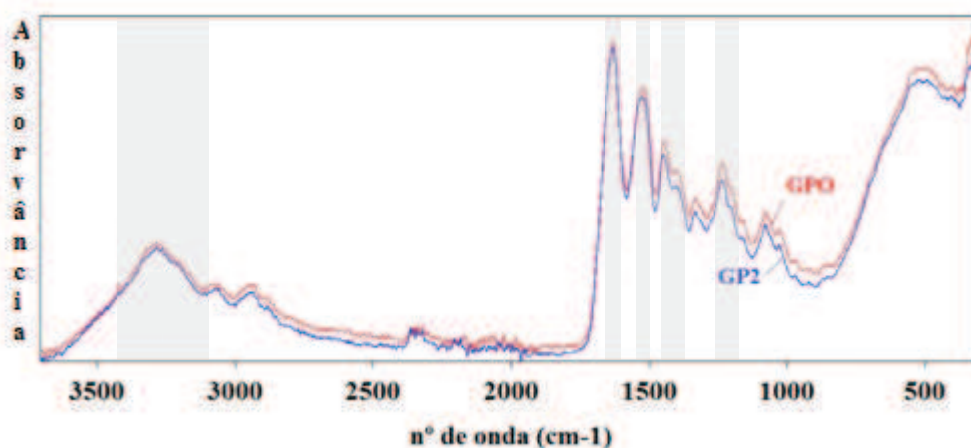
No intervalo  $1500\text{-}1200\text{cm}^{-1}$  verifica-se uma região que contém vibrações correspondentes a deformações da ligação  $\text{CH}_2$ . <sup>[39]</sup>



**Figura 3.16-** Representação gráfica dos espectros de FT-IR da gelatina tipo A.

Através da análise das amostras por FTIR averiguou-se se observar-se-iam alterações no espectro de infravermelho, devido ao processo de reticulação a que se submeteu a gelatina.

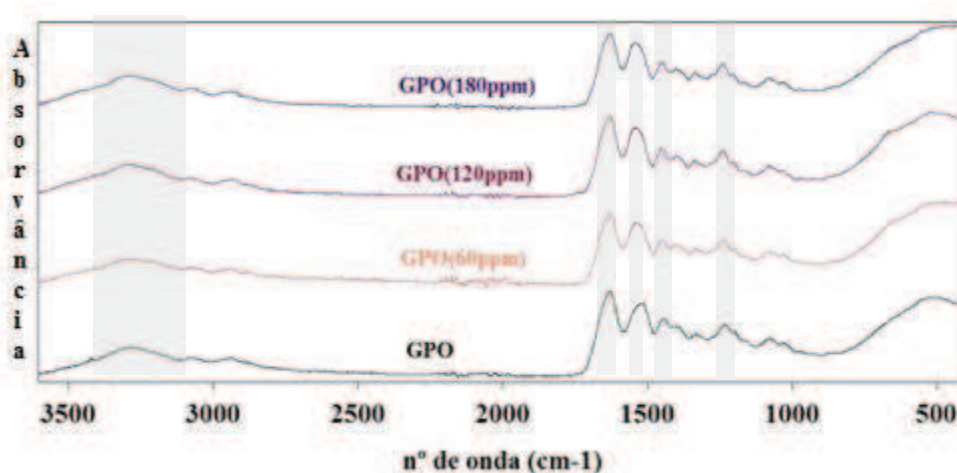
Através da sobreposição do espectro da gelatina tipo A sem reticulação, com o espectro da gelatina tipo A reticulada, figura 3.17, não se observam variações ao nível dos picos já identificados anteriormente. Isto pode ser pelo facto das ligações estabelecidas durante a reticulação da gelatina e da genipina serem do tipo amida, o que não se afasta muito ao tipo de ligações já patentes na própria gelatina.



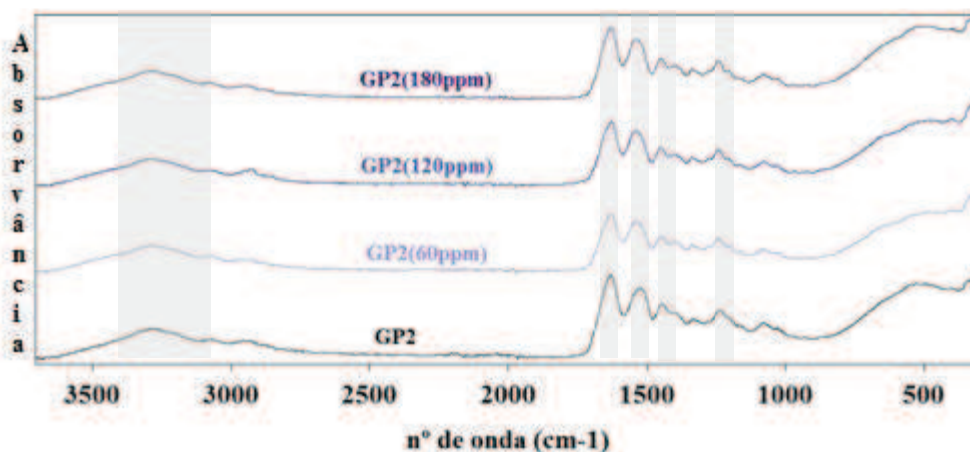
**Figura 3.17-** Espectros de FT-IR da gelatina de tipo A não reticulada versus reticulada, ou seja GPO e GP2, respectivamente.

Após a preparação dos nanocompósitos de gelatina com diferentes concentrações de nanoesferas de ouro, estes foram analisados através de FTIR, de modo a averiguar se existiriam variações, relativamente ao espectro do polímero reticulado e não reticulado.

Como pode verificar-se através da figura 3.18, não se observaram variações dos picos da gelatina com a adição de nanoesferas de ouro, nem variações entre os nanocompósitos com diferentes teores de nanoesferas de ouro, 60, 120 e 180 ppm. O mesmo se verificou para os nanocompósitos de gelatina reticulada com teores em ouro de 60, 120 e 180ppm, (figura 3.19).



**Figura 3.18-** Representação gráfica dos espectros de FT-IR dos nanocompósitos de gelatina do tipo A e os respectivos nanocompósitos com nanoesferas de ouro, com teores em ouro de 60, 120 e 180 ppm.



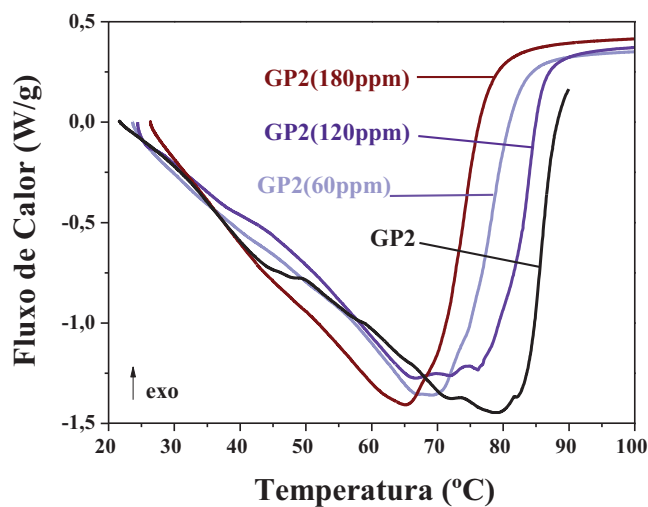
**Figura 3.19-** Representação gráfica dos espectros de FT-IR dos nanocompósitos de gelatina do tipo A, reticulada com genipina, e os respectivos nanocompósitos com nanoesferas de ouro, com teores de 60, 120 e 180ppm.

### 3.3.4. Propriedades térmicas

A caracterização da estabilidade térmica dos nanocompósitos de gelatina também se efectuou, à semelhança do que se fez com os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano, por DSC. No entanto, verificou-se alguma dificuldade na reprodutibilidade das curvas de DSC.

Os termogramas da gelatina reticulada e dos respectivos nanocompósitos de nanoesferas apresentam picos endotérmicos no intervalo de 65 a 80°C. No caso da gelatina reticulada, sem nanopartículas, este pico tem um máximo à temperatura de 80°C. A incorporação de nanoesferas de ouro conduz ao deslocamento deste pico para temperaturas menores; para um teor de 60 ppm o pico situa-se a 70°C e diminui para 65°C com o aumento do teor de ouro. Quando se duplica o teor em ouro para 120ppm, verifica-se uma variação de 3°C, ou seja o pico situa-se a aproximadamente a 72°C. E ao triplicar-se o teor de nanoesferas (180ppm) verifica-se uma diminuição da temperatura para 65°C. Estes resultados sugerem que a incorporação das nanoesferas de ouro interfere com a reticulação da gelatina.





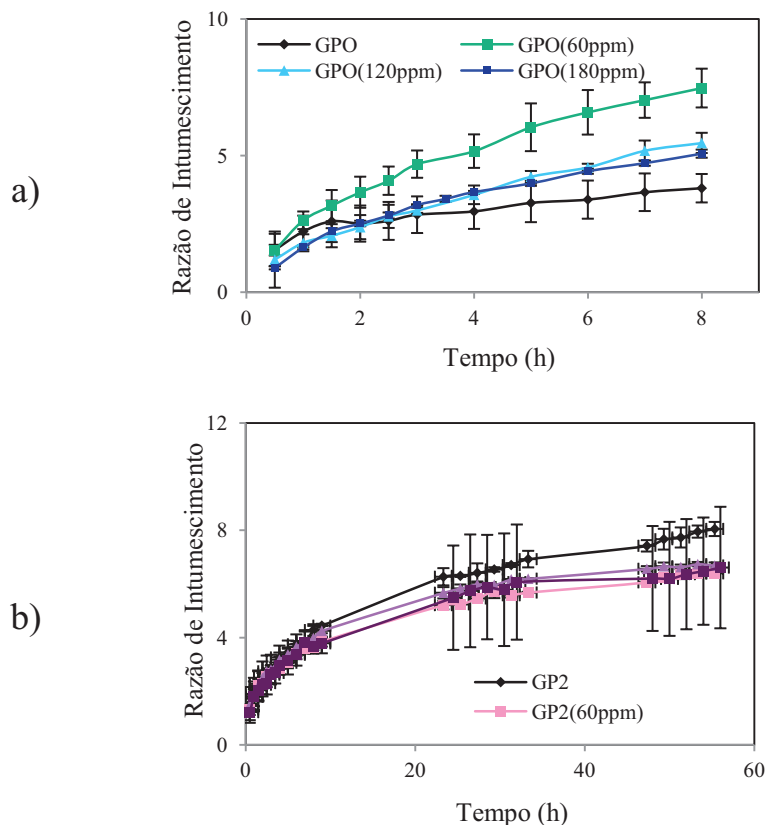
**Figura 3.20-** Termogramas de DSC para géis de gelatina reticulada, GP2, e os respectivos nanocompósitos de ouro com teores em nanoesferas ouro de 60, 120, 180 ppm.

Quanto aos nanocompósitos de gelatina não reticulada, não se conseguiu obter curvas de DSC reprodutíveis. Para cada amostra realizaram-se 5 análises de DSC e todas elas resultaram em curvas muito divergentes umas das outras.

### 3.3.5 Intumescimento

À semelhança do efectuado com os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano, relativamente aos ensaios de intumescimento, também se aplicou o mesmo procedimento aos nanocompósitos de gelatina, de modo a compreender melhor a sua cinética de intumescimento.

Na figura 3.21 encontram-se representadas as curvas da razão de intumescimento em função do tempo, para os nanocompósitos de gelatina contendo diferentes teores de nanoesferas de ouro.



**Figura 3.21** – Razão de intumescimento em função do tempo para os nanocompósitos de gelatina (a) não reticulados e (b) reticulados com genipina.

A análise das curvas da razão de intumescimento permitem verificar que os nanocompósitos reticulados são capazes de absorver água, sem se dissolverem, por um período bastante mais longo que os não reticulados. As gelatinas reticuladas mantêm a sua integridade após um período de imersão de 60 horas enquanto que as não reticuladas sofrem dissolução total após 8 horas de imersão.

A incorporação de nanoesferas de ouro na gelatina não reticulada induz, de um modo geral, a um aumento da quantidade de água absorvida pelo gel e a uma aceleração do intumescimento, (figura 3.21a). Este aumento, no entanto, não é proporcional ao aumento do teor de nanopartículas de ouro do nanocompósito. A introdução de nanoesferas de ouro num teor de 60 ppm conduz a um aumento da razão de intumescimento de equilíbrio, e isto está provavelmente relacionado com a introdução de estruturas com carga, as nanopartículas, no polímero. Ora estas vão conferir carga ao material, e consequentemente vai verificar-se um gradiente de cargas entre o material e o meio envolvente. Este

gradiente, juntamente com o gradiente já existente de concentrações, vai influenciar a pressão osmótica, o que resulta num maior fluxo de água para o interior do material.

No entanto, aumentando o teor de nanopartículas para 120 ppm e 180 ppm conduz a uma diminuição na razão de intumescimento do gel.

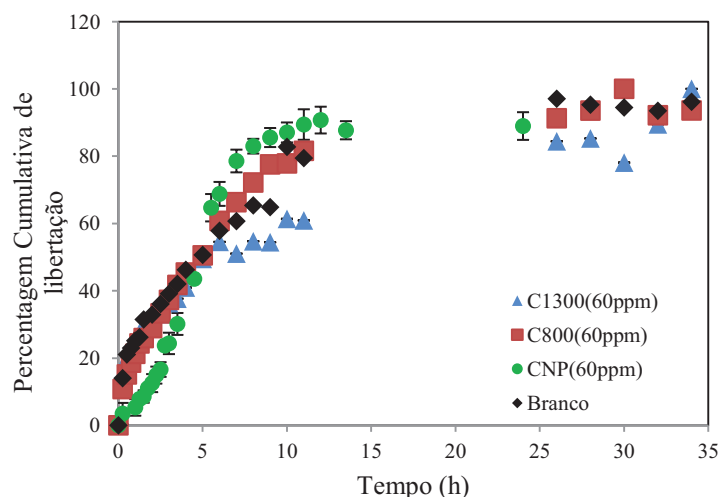
Este comportamento poderá, estar relacionado com o seguinte, as nanoesferas encontram-se estabilizadas com citrato, e tendo em conta que a gelatina A tem grupos positivos, poderá haver uma interacção entre ambos que resulte num reforço das propriedades mecânicas do gel que limite a absorção de água, conduzindo a menores valores de intumescimento.

No caso nos nanocompósitos de gelatina reticulada, a razão de intumescimento de equilíbrio não variou, significativamente, com o aumento do teor de nanoesferas de ouro. Este comportamento, provavelmente, deve-se ao facto de, por se tratar de estruturas que estão reticuladas quimicamente, apresentam melhores propriedades mecânicas que as estruturas não reticuladas, e mais resistência a expandirem-se devido à difusão das moléculas de água para a matriz.

### 3.4. Ensaio de Libertação

#### 3.4.1. Nanocompósitos de $\kappa$ -Carragenano

Para a realização de estudos de libertação *in vitro* seleccionaram-se nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano com um teor de fase dispersa de 60ppm. Variou-se o tipo de fase dispersa em estudo, utilizando-se nanocompósitos com nanoesferas de ouro, nanobastonetes *curtos* e nanobastonetes *longos*. Na figura 3.22 apresentam-se os perfis de libertação de azul-de-metileno obtidos a 37°C, para nanocompósitos de carragenano com nanobastonetes *curtos* C800(60ppm), nanobastonetes *longos* C1300(60ppm) e para o branco (polímero sozinho).



**Figura 3.22-** Perfis de liberação do azul de metileno, do  $\kappa$ -carragenano, e dos respectivos nanocompósitos com nanopartículas de ouro (60 ppm).

Os nanocompósitos com nanobastonetes apresentam um perfil de liberação semelhante ao do carragenano sozinho. A liberação é mais rápida inicialmente e depois tende a abrandar. No caso dos nanocompósitos preparados com nanobastonetes *longos* a liberação é menor nesta etapa final. Isto poder-se-á dever, tal como já se discutiu nos resultados de intumescimento, ao efeito de reforço da estrutura do gel por parte dos nanobastonetes mais compridos, evitando o seu colapso, dissolução do gel, retardando a difusão do fármaco modelo, devido à manutenção das estruturas de redes poliméricas do gel que promovem a resistência à difusão do fármaco modelo.

Os nanocompósitos com nanoesferas de ouro apresentam um perfil ligeiramente diferente. A liberação é mais lenta nas primeiras 5 horas e posteriormente mais rápida, resultando um perfil sigmoidal. Dado que para um teor de 60 ppm os compósitos com nanoesferas apresentam um módulo elástico semelhante ao dos nanocompósitos com nanobastonetes *curtos*, a menor velocidade de liberação inicial não poderá ser explicada com base em diferenças no reforço do gel. Uma possível explicação poderá ser a possível interacção entre as nanoesferas de ouro e as moléculas de azul de metileno que limite a liberação deste composto <sup>[40]</sup>. O elevado valor de intumescimento no equilíbrio do nanocompósito com nanoesferas poderá explicar a maior liberação de azul de metileno na etapa final.

### Modelação cinética da Libertação do Fármaco

Com os dados obtidos através dos ensaios de libertação, e tendo em conta os modelos já abordados em 1.1.2, realizou-se a modelação cinética dos dados segundo estes modelos. Os gráficos relativos à modelação cinética dos dados, para cada modelo, encontram-se no Anexo B e os parâmetros cinéticos estimados, assim como o coeficiente de determinação encontram-se na tabela 3.4

**Tabela 3.4** - Parâmetros cinéticos ( $k$  e  $n$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) resultantes da aplicação dos modelos cinéticos, aos dados de libertação dos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano.

		Korsmeyer-Peppas	Ordem Zero	Ordem 1	Higuchi	Hixson-Crowell
Branco	$r^2$	0,986	0,975	0,874	0,992	0,900
	$k$	0,26	0,062	0,14	0,21	-0,015
	$n$	0,42	-	-	-	-
CNP(60ppm)	$r^2$	0,987	0,948	0,954	0,936	0,966
	$k$	0,051	0,098	0,52	0,37	-0,035
	$n$	1,39	-	-	-	-
C800(60ppm)	$r^2$	0,996	0,991	0,870	0,989	0,923
	$k$	0,21	0,075	0,18	0,27	-0,018
	$n$	0,51	-	-	-	-
C1300(60ppm)	$r^2$	0,988	0,923	0,823	0,980	0,869
	$k$	0,25	0,0041	0,12	0,15	-0,013
	$n$	0,38	-	-	-	-

Através da análise aos coeficientes de determinação resultantes da modelação dos dados experimentais, verifica-se que de forma geral o modelo que descreve melhor os dados é o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Este modelo ajusta-se bem ao comportamento da cinética de modelação, como seria de esperar, uma vez que se trata de um modelo desenvolvido para libertação em hidrogéis, tal como os materiais em estudo.

Ao analisar os valores do parâmetro  $n$  é possível determinar o mecanismo que rege a libertação do fármaco. Para o branco, o valor obtido para o parâmetro  $n$  é de 0,42 encontrando-se perto de 0,45 (valor de  $n$  indicativo do mecanismo de difusão fickiana – tabela 1.2), e portanto pode considerar-se que a cinética de libertação é regida por difusão fickiana.

Relativamente aos nanocompósitos com nanoesferas de ouro, CNP(60ppm), verifica-se que o valor de  $n$  é de 1,39. Dado que é superior a 0,89 pode-se concluir que o mecanismo de libertação é do tipo super caso de transporte II, ou seja a libertação é controlada pela relaxação das cadeias poliméricas e erosão da matriz polimérica. Este mecanismo foi identificado também em géis de carragenano compósitos magnéticos que apresentavam elevados valores de intumescimento no equilíbrio.<sup>[41]</sup>

Já no caso dos dados obtidos a partir dos ensaios de libertação dos nanocompósitos com nanobastonetes *curtos*, C800(60ppm), o valor de  $n$  foi de 0,53, o que corresponde a ao mecanismo de transporte anómalo, ou seja verifica-se a contribuição dos fenómenos de difusão fickiana e relaxamento do polímero.

Por fim, para os nanocompósitos com nanobastonetes *longos*, C1300(60ppm), obteve-se um valor de  $n$  de 0,38. Apesar de ainda se afastar um pouco de 0,45, pode considerar-se que o mecanismo de difusão é quasi-fickiano.

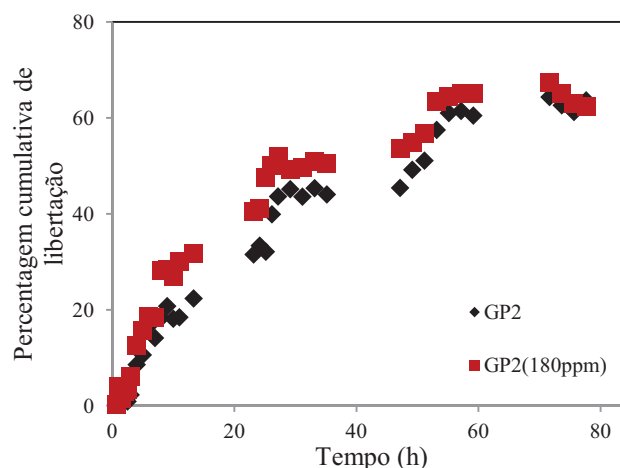
Para além do modelo de Korsenmeyer-Peppas, também para o modelo de Higuchi se registou um bom ajuste dos dados. Ora isto não é estranho, uma vez que o modelo de Higuchi é igual ao modelo de Korsenmeyer-Peppas para  $n=0,5$ , ou seja quando o mecanismo é controlado por difusão, para o caso de geometria plana.

### 3.4.2. Nanocompósitos de Gelatina

Para os estudos de libertação nos nanocompósitos de gelatina, seleccionaram-se os nanocompósitos reticulados com 180ppm em ouro. No caso das gelatinas reticuladas, dado o teor de nanopartículas de ouro não parecer afectar de modo significativo o intumescimento do gel, decidiu seleccionar-se o nanocompósito com maior teor em ouro.

Nestes ensaios procurou-se apenas estudar o efeito das nanopartículas na estrutura do nanocompósito e a consequente influencia na libertação de um fármaco modelo.

Na figura 3.23 apresentam-se os perfis de libertação das amostras de gelatina reticulada sem nanopartículas de ouro, GP2, e com nanopartículas de ouro, GP2(180ppm).



**Figura 3.23-** Perfis de libertação do azul de metileno dos nanocompósitos de gelatina reticulada com um teor em ouro de 180ppm.

Como pode verificar-se através da figura 3.23, ao adicionar-se nanoesferas de ouro à gelatina, o perfil de libertação do nanocompósito não se afasta muito do perfil de libertação da gelatina sem nanopartículas, tal como seria de esperar com base nos resultados de intumescimento.

### Modelação cinética da libertação do fármaco

De modo a melhor compreender-se a cinética de libertação do fármaco modelo, realizou-se uma modelação aos dados do perfil de libertação do fármaco modelo, tendo em conta os modelos referidos em 1.1.2. Os gráficos com a modelação cinética encontram-se no Anexo B e os parâmetros cinéticos calculados estão indicados na tabela 3.5.

**Tabela 3.5** – Tabela representativa dos valores relativos às constantes de determinação aplicáveis a cada modelo cinético aplicado.

		Korsmeyer-Peppas	Ordem Zero	Ordem 1	Higuchi	Hixson-Crowell
GP2	$r^2$	0,957	0,905	0,738	0,968	0,850
	k	0,041	0,0079	0,058	0,086	-0,0041
	n	0,67	-	-	-	-
GP2(180ppm)	$r^2$	0,943	0,937	0,819	0,965	0,887
	k	0,072	0,029	0,25	0,095	-0,017
	n	0,56	-	-	-	-

Analisando as constantes de determinação, para a gelatina reticulada sem ouro, GP2, e com ouro, GP2(180ppm), verificou-se que o modelo que melhor ajustou os dados experimentais foi o modelo de Higuchi. No entanto, veja-se que a constante de determinação obtida não foi muito alta. Também se verificou isto para o modelo Korsmeyer-Peppas e cinética de ordem zero.

Tendo em conta a correlação de Korsmeyer-Peppas, analisando os valores de  $n$ , maiores que 0,45, para a gelatina reticulada sem ouro e com ouro, GP2 e GP2(180ppm), respectivamente, verifica-se que o mecanismo de libertação do sistema é anómalo, ou seja encontra-se na região onde se verifica uma contribuição dos dois fenómenos o de difusão e o de relaxamento das cadeias poliméricas.

Relativamente ao modelo de ordem zero compreende-se que este ajuste de modo razoável aos dados experimentais relativos, visto tratar-se de um modelo que caracteriza bem sistemas de libertação lenta e continuada, como foi o caso.





#### 4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

O trabalho realizado permite concluir que, a combinação de hidrogéis e nanopartículas de ouro, resulta em materiais com propriedades muito interessantes e com bastante potencial para a libertação controlada de fármacos.

De um modo geral, os nanocompósitos resultantes apresentavam as propriedades ópticas das nanopartículas de ouro, ou seja, as bandas de absorção de plasmão características destas. Nos nanocompósitos de gelatina reticulada a observação da banda de plasmão das nanopartículas foi dificultada pela presença do reticulante genipina.

A temperatura de fusão do  $\kappa$ -carragenano aumentou com a adição de nanopartículas de ouro. Este efeito foi mais marcante com a adição de nanoesferas do que com nanobastonetes e parece aumentar ligeiramente com o teor de nanopartículas. O aumento da temperatura de fusão sugere que as nanopartículas de ouro reforçam a estrutura do gel de  $\kappa$ -carragenano, o que foi confirmado pelas análises dinâmico-mecânicas. A adição de nanobastonetes *longos* resultou num aumento do módulo elástico mais pronunciado. Os resultados da análise térmica sugerem ainda que a introdução de partículas anisotrópicas (nanobastonetes), confere mais heterogeneidade à rede polimérica do  $\kappa$ -carragenano, do que a adição das nanoesferas. No entanto esta melhoria da estabilidade térmica já não se registou para os nanocompósitos de gelatina, onde se verificou uma diminuição da temperatura de fusão com a adição de nanopartículas de ouro, sugerindo que a presença das nanopartículas interfere com a reticulação da gelatina.

Os resultados dos ensaios de intumescimento sugerem a coexistência de dois fenómenos, que influenciam o intumescimento dos nanocompósitos. Um efeito relacionado com o aumento do fluxo de entrada de água no gel para contrabalançar o aumento da pressão osmótica, resultante da incorporação de nanopartículas com carga superficial, e um efeito de reforço da estrutura da rede polimérica, por parte das nanopartículas. O primeiro promove o intumescimento do gel, enquanto que o segundo o limita. Para alguns dos sistemas nanocompósitos não foi possível justificar o comportamento de intumescimento à luz destes dois efeitos o que sugere a existência de outros factores e justifica a necessidade de estudos futuros mais detalhados para compreender este fenómeno.

Nos estudos de libertação observou-se a libertação gradual do azul de metileno. Quanto à modelação cinética dos dados, de um modo geral, o modelo de Korsmeyer-

Peppas fez um ajuste razoável dos dados. Isto verificou-se mais para os nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano. No caso dos nanocompósitos de gelatina o modelo de Higuchi apresentou melhor ajuste, apesar do modelo de Korsmeyer-Peppas também funcionar bem. A libertação no  $\kappa$ -carragenano e na gelatina parece ser controlada sobretudo por difusão. Nos géis de  $\kappa$ -carragenano a adição de nanopartículas parece afectar o mecanismo de libertação, em particular no caso das nanoesferas, passando a libertação a ser controlada pela relaxação da estrutura polimérica.

Dado que os nanocompósitos preparados neste trabalho são sensíveis à temperatura (tal como verificado pelos ensaios de análise térmica) e apresentam as propriedades ópticas das nanopartículas de ouro, como trabalho futuro seria interessante estudar o efeito fototérmico destes sistemas, isto é, estudar o efeito da absorção de radiação, com comprimento de onda na zona do plasmão, de modo a verificar se ocorreriam alterações na estrutura do gel, que pudessem influenciar o perfil de libertação do fármaco. Para os nanocompósitos de nanobastonetes este estudo seria particularmente interessante, dado que a banda de plasmão se encontra na zona do infravermelho próximo, ao qual o corpo humano é transparente.

Seria ainda interessante, no caso dos sistemas envolvendo gelatina, incluir também nanopartículas de prata. No decorrer do trabalho experimental houve dificuldade em manter os nanocompósitos de gelatina sem fungos durante um espaço de tempo aceitável. Tendo em conta as propriedades anti-fúngicas e anti-microbianas das nanopartículas de prata, a sua incorporação nos compósitos poderia ser uma solução.

## 5. Referências

- [1] Raniero, L. *As metas da nanotecnologia: Aplicações e Implicações*. [citado em 2011] [2005]; Disponível em:  
[http://dei-s1.dei.uminho.pt/nanotec/download/6.\\_Nanotecnologias.pdf](http://dei-s1.dei.uminho.pt/nanotec/download/6._Nanotecnologias.pdf).
- [2] Guo, R., L. Zhang, H. Qian, R. Li, X. Jiang, and B. Liu, *Multifunctional Nanocarriers for Cell Imaging, Drug Delivery, and Near-IR Photothermal Therapy*. *Langmuir*, 2010. 26(8): p. 5428-5434.
- [3] Satarkar, N.S., D. Biswal, and J.Z. Hilt, *Hydrogel nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials*. *Soft Matter*, 2010. 6(11): p. 2364-2371.
- [4] Coelho, J., P. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A. Fonseca, J. Góis, and M. Gil, *Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments*. *The EPMA Journal*, 2010. 1(1): p. 164-209.
- [5] Jeong, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. 54(1): p. 37-51.
- [6] Liu, T.-Y., S.-H. Hu, K.-H. Liu, D.-M. Liu, and S.-Y. Chen, *Preparation and characterization of smart magnetic hydrogels and its use for drug release*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2006. 304(1): p. e397-e399.
- [7] Yamamoto M., I.Y.a.T.Y., *Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2001. 12: p. 77-88.
- [8] Young, S., M. Wong, Y. Tabata, and A.G. Mikos, *Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules*. *Journal of Controlled Release*, 2005. 109(1-3): p. 256-274.

- [9] Coviello, T., P. Matricardi, C. Marianecci, and F. Alhaique, *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*. Journal of Controlled Release, 2007. 119(1): p. 5-24.
- [10] Campo, V.L., D.F. Kawano, D.B.d. Silva Jr, and I. Carvalho, *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review*. Carbohydrate Polymers, 2009. 77(2): p. 167-180.
- [11] Snoeren, T.H.M. and T.A.J. Payens, *On the sol-gel transition in solutions of Kappa-carrageenan*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1976. 437(1): p. 264-272.
- [12] Morris, E.R., D.A. Rees, and G. Robinson, *Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure*. Journal of Molecular Biology, 1980. 138(2): p. 349-362.
- [13] *Gelatin*. [citado em 2011]; Disponível em: <http://www.gelatin.co.za/gltln1.html>.
- [14] Chiono, V., E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahluwalia, and P. Giusti, *Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. 19(2): p. 889-898.
- [15] Song, F., L.-M. Zhang, C. Yang, and L. Yan, *Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. 373(1-2): p. 41-47.
- [16] Vaandering, B. *Genipin*. [citado em 2011] [2006]; Disponível em: [http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects\\_2006/Vaandering/Genipin.htm](http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm).
- [17] Butler, M.F., Y.-F. Ng, and P.D.A. Pudney, *Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and*

- genipin*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003. 41(24): p. 3941-3953.
- [18] Nickerson, M.T., A.T. Paulson, E. Wagar, R. Farnworth, S.M. Hodge, and D. Rousseau, *Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels*. Food Hydrocolloids, 2006. 20(7): p. 1072-1079.
- [19] Thakur, G., A. Mitra, D. Rousseau, A. Basak, S. Sarkar, and K. Pal, *Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010: p. 1-9.
- [20] Lin, C.-C. and A.T. Metters, *Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. 58(12-13): p. 1379-1408.
- [21] Fu, Y. and W.J. Kao, *Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2010. 7(4): p. 429-444.
- [22] Suvakanta Dash, P.N.M., Lilakanta Nath and Prasanta Chowdhury, *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*. Acta Poloniae - Drug Research, 2010. 67(3): p. 7.
- [23] Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. 13(2): p. 123-133.
- [24] Ramesh, N.A. *Modeling of Dissolution Data*. Department of Pharmaceutics, Aissms College of Pharmacy, Pune, Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/28977662/Modeling-of-Dissolution-Data>.

- [25] Siepmann, J. and N.A. Peppas, *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. 48(2-3): p. 139-157.
- [26] Sun, W.C.T.G.H.H.J., *Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology*. Nanotechnology, Science and Applications, 2008. 1: p. 17-32.
- [27] Sharma, V., K. Park, and M. Srinivasarao, *Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2009. 65(1-3): p. 1-38.
- [28] Jain, P.K., I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, *Au nanoparticles target cancer*. Nano Today, 2007. 2(1): p. 18-29.
- [29] Pissuwan, D., S.M. Valenzuela, and M.B. Cortie, *Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles*. Trends in Biotechnology, 2006. 24(2): p. 62-67.
- [30] Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2003. 104(1): p. 293-346.
- [31] Meyvis, T.K.L., B.G. Stubbe, M.J. Van Steenberg, W.E. Hennink, S.C. De Smedt, and J. Demeester, *A comparison between the use of dynamic mechanical analysis and oscillatory shear rheometry for the characterisation of hydrogels*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. 244(1-2): p. 163-168.
- [32] Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, *Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method*. Chemistry of Materials, 2003. 15(10): p. 1957-1962.

- [33] Pérez-Juste, J., I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, and P. Mulvaney, *Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2005. 249(17-18): p. 1870-1901.
- [34] Gou, L. and C.J. Murphy, *Fine-Tuning the Shape of Gold Nanorods*. Chemistry of Materials, 2005. 17(14): p. 3668-3672.
- [35] Daniel-da-Silva, A.L., T. Trindade, B.J. Goodfellow, B.F.O. Costa, R.N. Correia, and A.M. Gil, *In Situ Synthesis of Magnetite Nanoparticles in Carrageenan Gels*. Biomacromolecules, 2007. 8(8): p. 2350-2357.
- [36] Iijima, M., T. Hatakeyama, M. Takahashi, and H. Hatakeyama, *Effect of thermal history on kappa-carrageenan hydrogelation by differential scanning calorimetry*. Thermochimica Acta, 2007. 452(1): p. 53-58.
- [37] Schacht, E., B. Bogdanov, A.V.D. Bulcke, and N. De Rooze, *Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde*. Reactive and Functional Polymers, 1997. 33(2-3): p. 109-116.
- [38] Vandelli, M.A., F. Rivasi, P. Guerra, F. Forni, and R. Arletti, *Gelatin microspheres crosslinked with ,-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. 215(1-2): p. 175-184.
- [39] Hashim, D.M., Y.B.C. Man, R. Norakasha, M. Shuhaimi, Y. Salmah, and Z.A. Syahariza, *Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins*. Food Chemistry, 2010. 118(3): p. 856-860.
- [40] Narband, N., M. Uppal, C.W. Dunnill, G. Hyett, M. Wilson, and I.P. Parkin, *The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionic dyes: enhanced*



*UV-visible absorption*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. 11(44): p. 10513-10518.

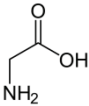
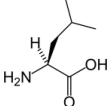
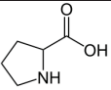
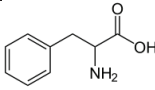
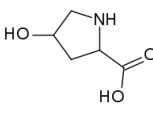
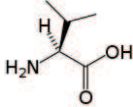
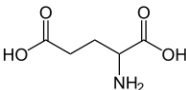
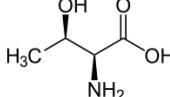
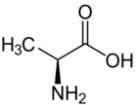
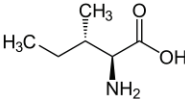
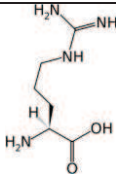
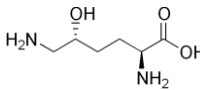
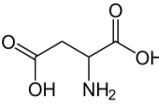
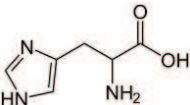
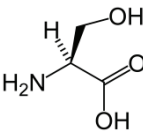
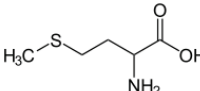
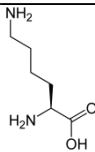
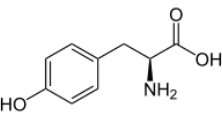
- [41] Daniel-da-Silva, A.L., J. Moreira, R. Neto, A.C. Estrada, A.M. Gil, and T. Trindade, *Impact of magnetic nanofillers in the swelling and release properties of  $\kappa$ -carrageenan hydrogel nanocomposites*. Carbohydrate Polymers, 2012(87): p. 238 - 235.

# Anexos

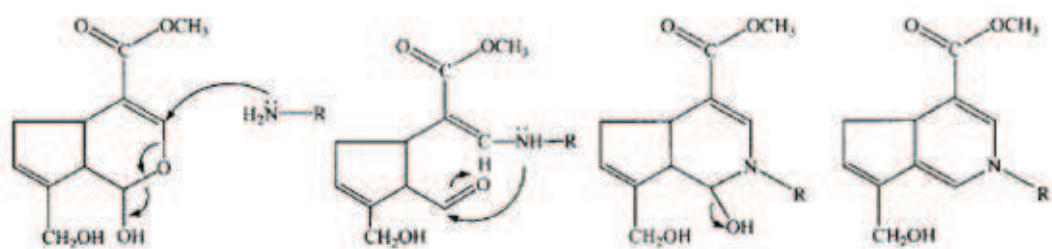


## Anexo A – Gelatina

**Tabela A. 1-** Tabela representativa da distribuição de aminoácidos na gelatina e as respectivas percentagens

Aminoácidos na Gelatina	Percentagem	Aminoácidos na Gelatina	Percentagem
Glicina 	21,4%	Leucina 	3,3%
Prolina 	12,4%	Fenilalanina 	2,4%
Hidroxiprolina 	11,9%	Valina 	2,2%
Ácido Glutâmico 	10,0%	Treonina 	2,1%
Alanina 	8,9%	Isoleucina 	1,5%
Arginina 	7,8%	Hidroxilisina 	1,0%
Ácido Aspártico 	6,0%	Histidina 	0,8%
Serina 	3,6%	Metionina 	0,7%
Lisina 	3,5%	Tirosina 	0,5%

## Mecanismo de Reacção I



## Mecanismo de Reacção II

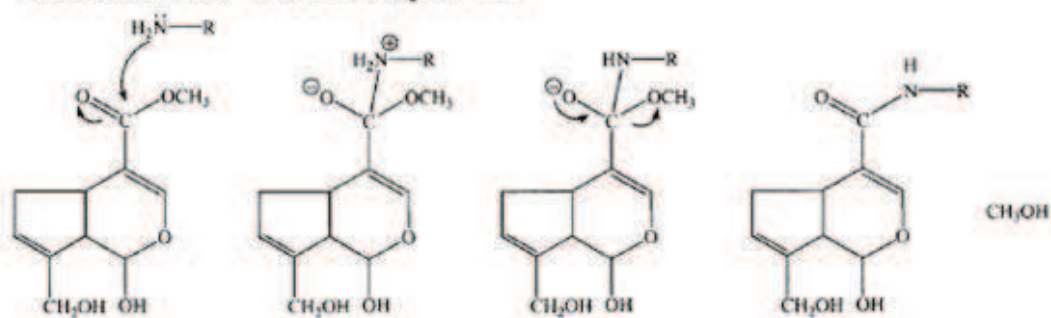
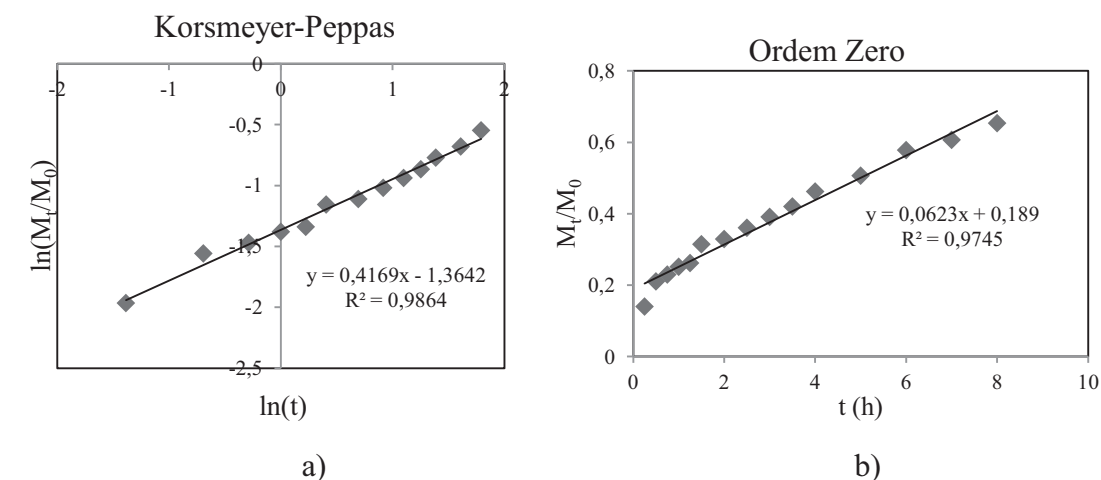


Figura A. 1- Mecanismos de reacção de reticulação da genipina e da gelatina (adaptado de<sup>[17]</sup>)

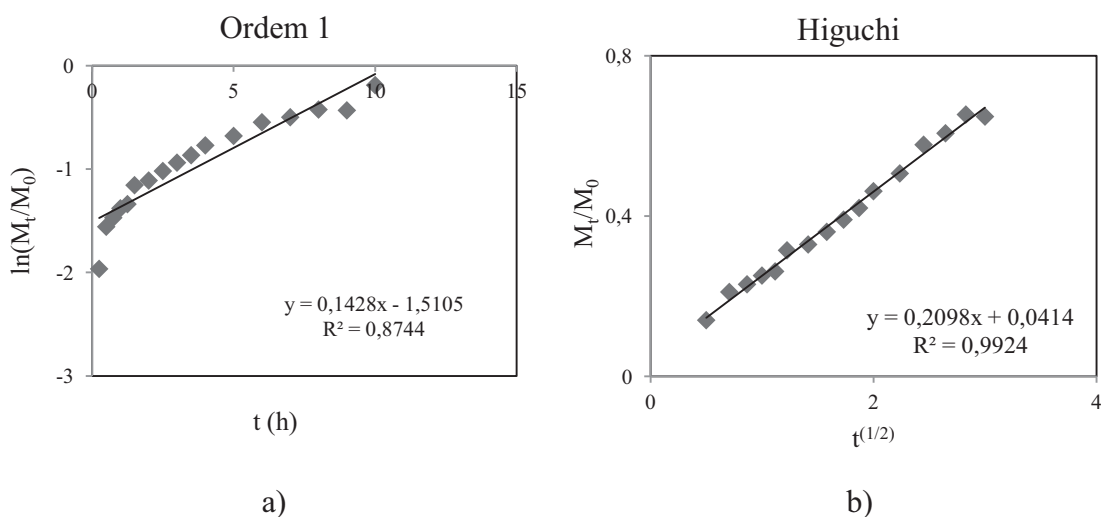
## Anexo B - Modelação da cinética de libertação

### B.1 - Modelação da cinética de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano

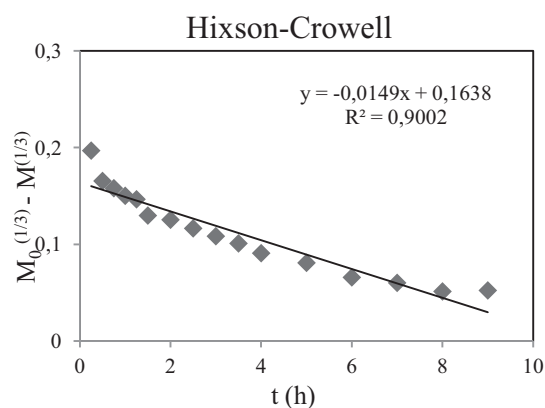
#### B.1.1.1- Modelação Cinética dos dados de libertação no Branco



**Figura B. 1** - Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação do branco, relativamente ao modelo de Korsmeyer-Peppas(a) e cinética de ordem zero (b).

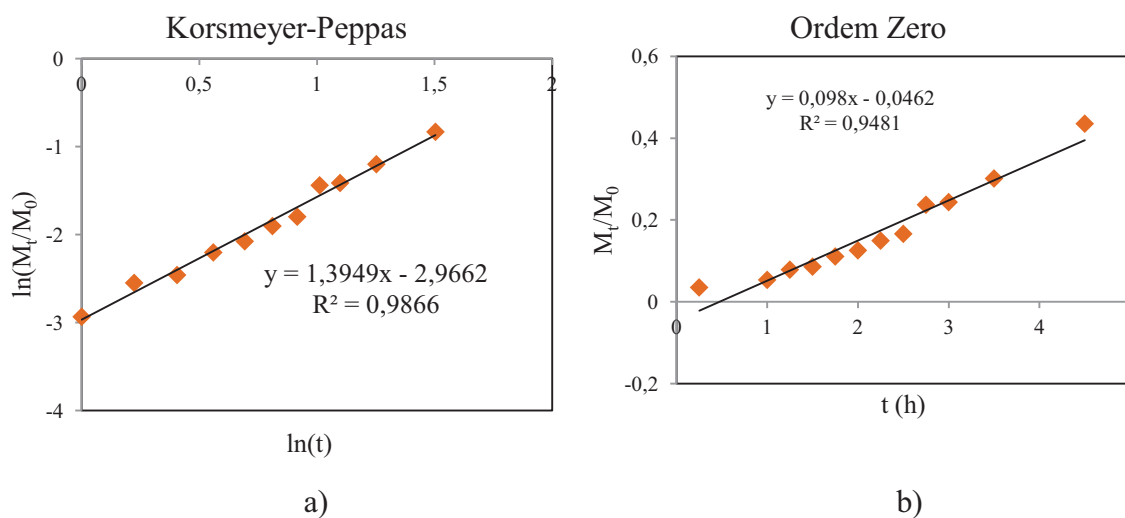


**Figura B. 2-** Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação do branco, relativamente à cinética de 1ª ordem (a), e ao modelo de Higuchi (b).

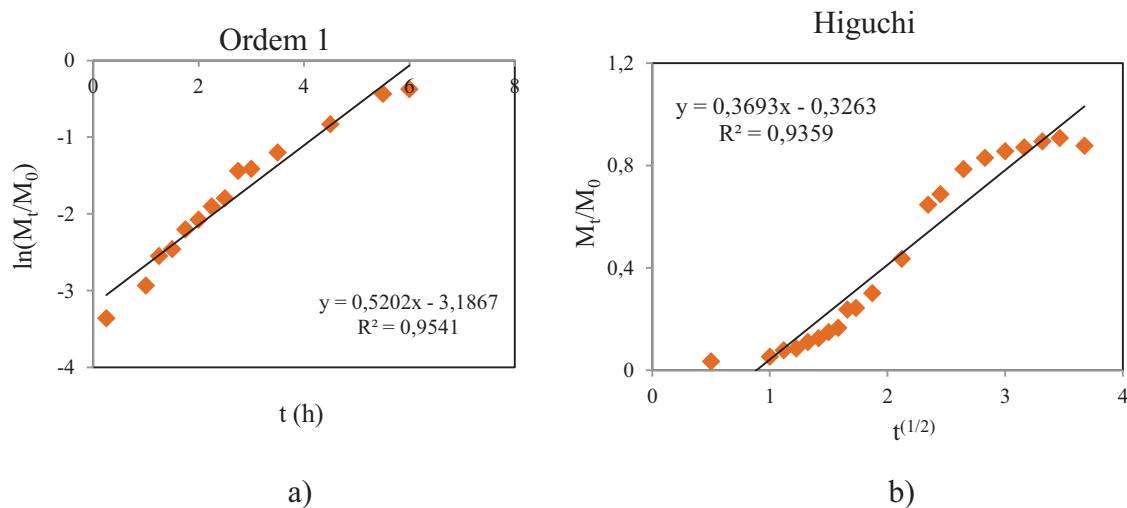


**Figura B. 3-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do branco, relativamente ao modelo de Hixson-Crowell.

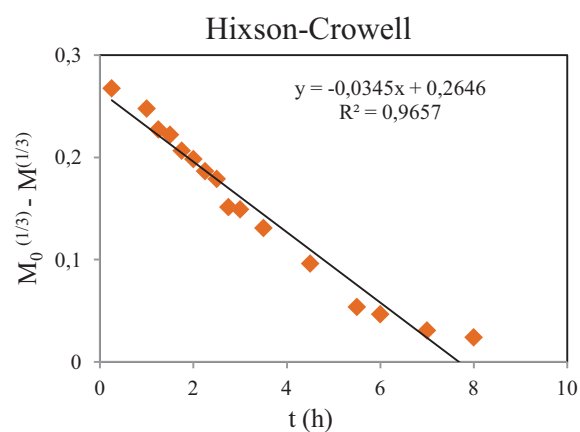
B.1.1.2- Modelação Cinética dos dados de liberação nos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano e nanoesferas de ouro, CNP(60ppm).



**Figura B. 4-** Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano com nanoesferas de ouro, CNP(60ppm), relativamente ao modelo de Korsmeyer-Peppas(a) e cinética de ordem zero (b).



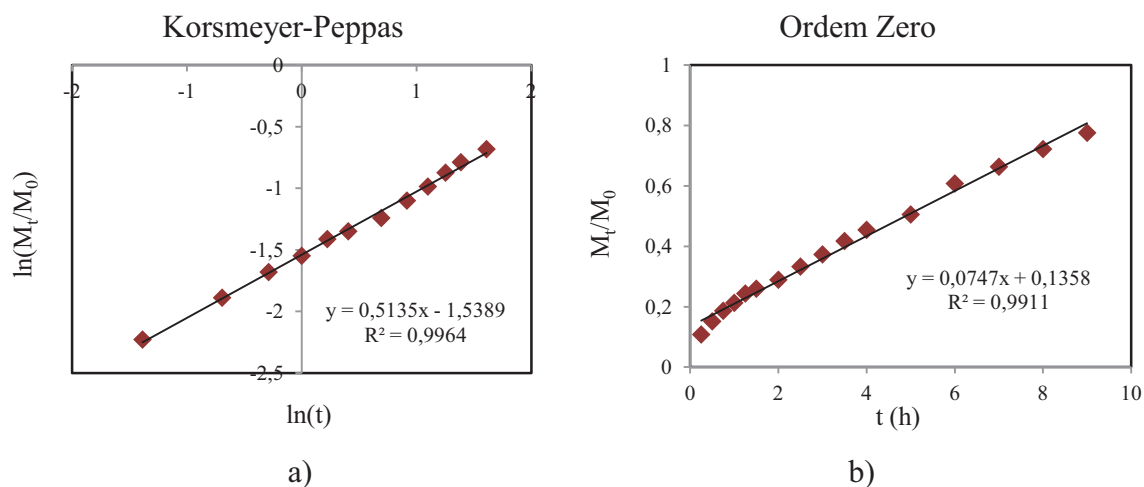
**Figura B. 5** - Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano com nanoesferas de ouro, CNP(60ppm), relativamente à cinética de 1ª ordem (a), e ao modelo de Higuchi (b).



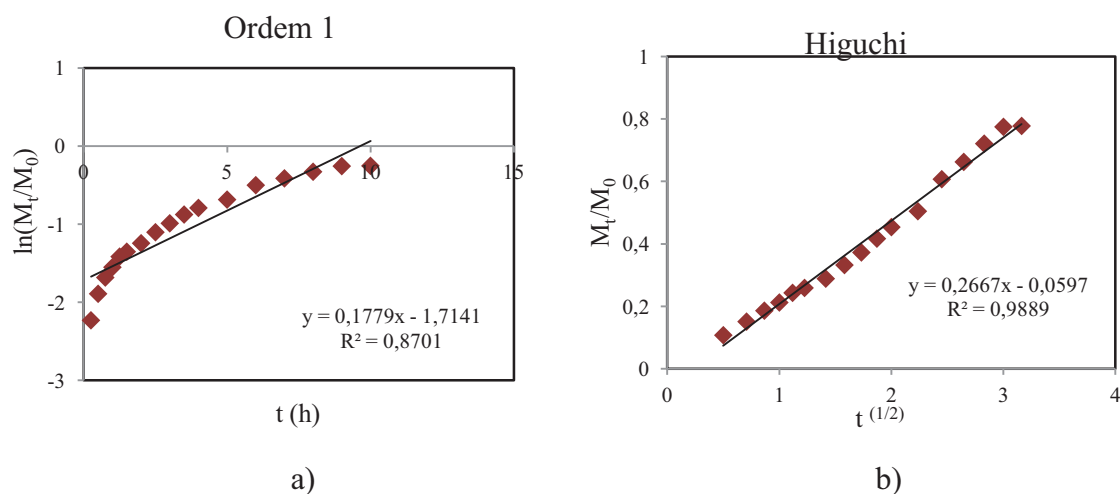
**Figura B. 6**- Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano de nanoesferas de ouro, CNP(60ppm), relativamente ao modelo de Hixson-Crowell.



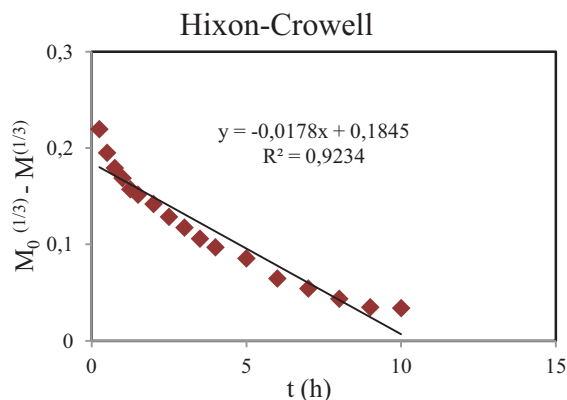
### B.1.1.3- Modelação Cinética dos dados de libertação nos nanocompósitos de $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes *curtos*.



**Figura B. 7-** Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano com nanobastonetes *curtos*, C800(60ppm), relativamente ao modelo de Korsmeyer-Peppas(a) e cinética de ordem zero (b).

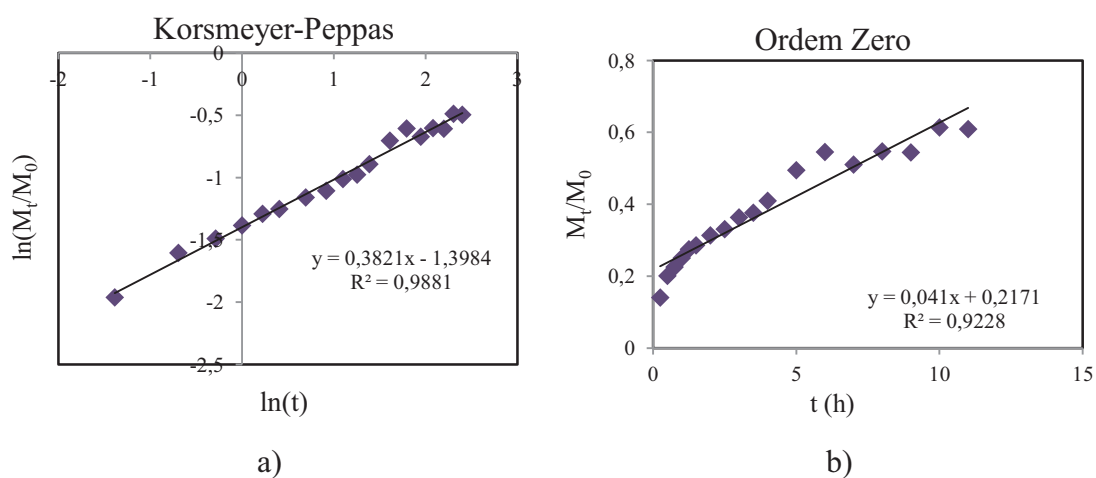


**Figura B. 8 -** Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano com nanobastonetes *curtos*, C800(60ppm) relativamente à cinética de 1ª ordem (a), e ao modelo de Higuchi (b).

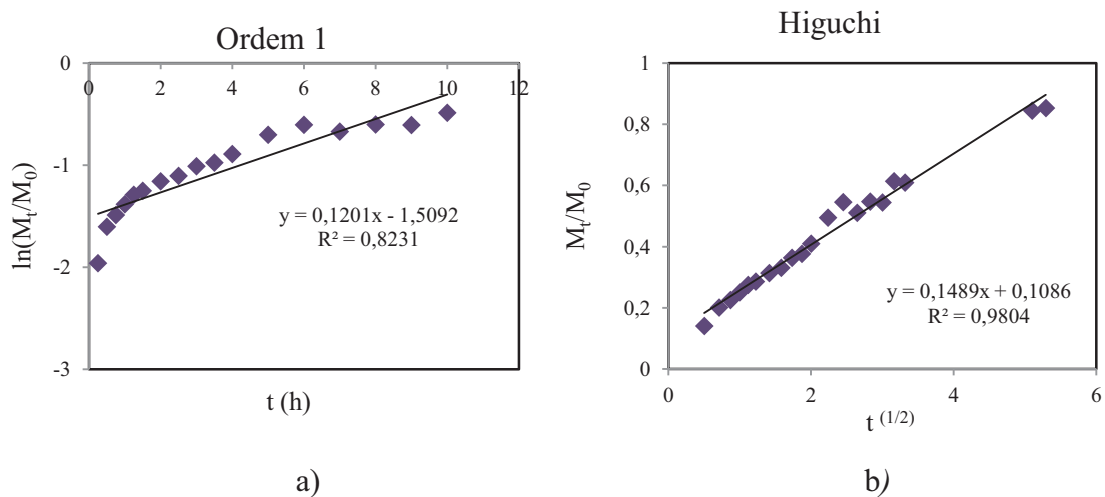


**Figura B. 9-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano de nanobastonetes de ouro *curtos*, C800(60ppm), relativamente ao modelo de Hixson-Crowell.

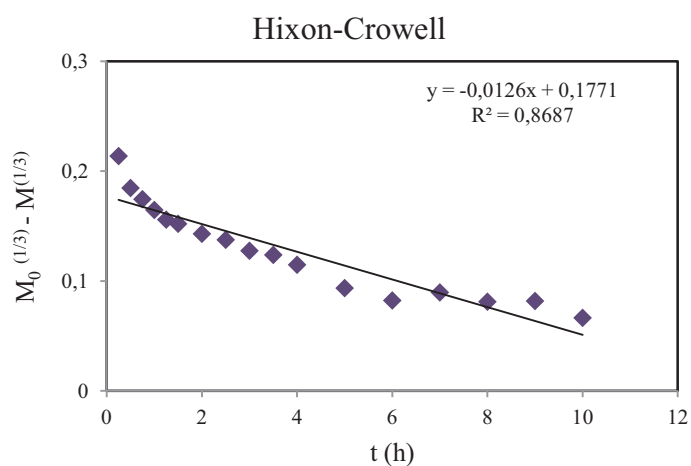
B.1.1.4- Modelação Cinética dos dados de liberação nos nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes *longos*.



**Figura B. 10 -** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes *longos*, C1300(60ppm), relativamente ao modelo de Korsmeyer-Peppas(a) e Ordem Zero (b).



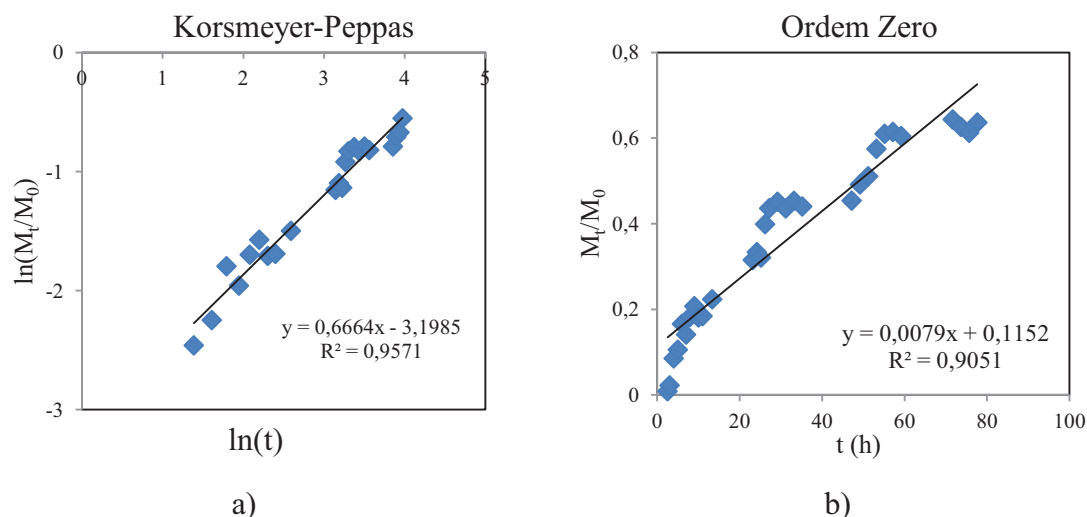
**Figura B. 11-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes *longos*, C1300(60ppm), relativamente à cinética de 1ª Ordem(a) e o modelo de Higuchi.



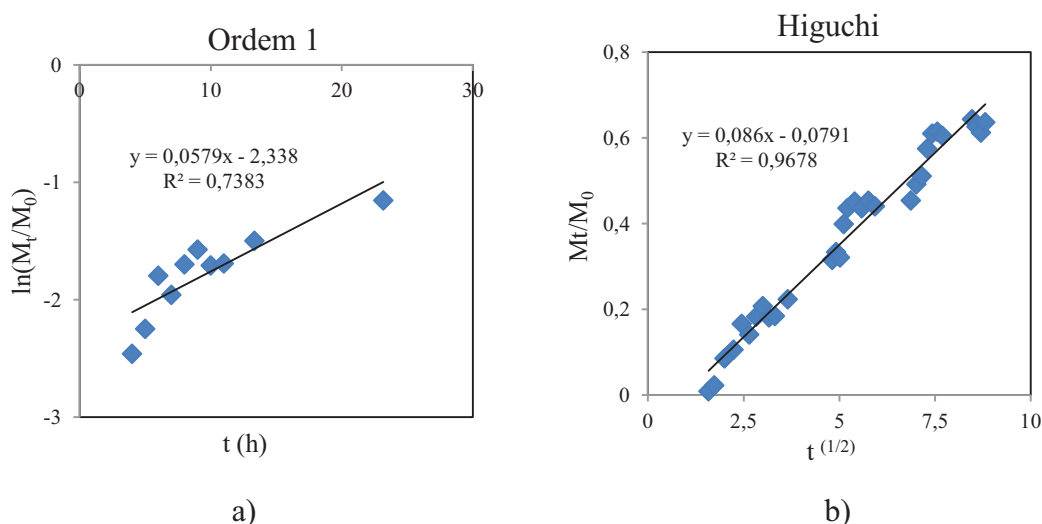
**Figura B. 12 -** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de  $\kappa$ -carragenano e nanobastonetes *longos*, C1300(60ppm), relativamente ao modelo de Hixson-Crowell).

## B.2 – Modelação da cinética de libertação nos nanocompósitos de gelatina com nanocompósitos de ouro.

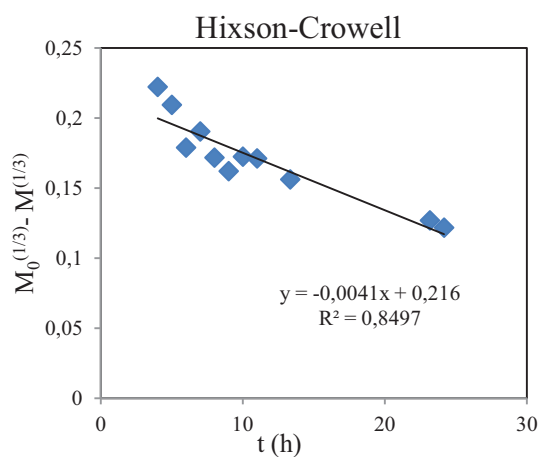
### B.2.1 – Modelação dos dados de libertação para a gelatina não reticulada sem ouro, GP2.



**Figura B. 13-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de libertação da gelatina reticulada sem ouro, GP2, relativamente ao modelo ao modelo Korsmeyer(a) e cinética de ordem zero (b).

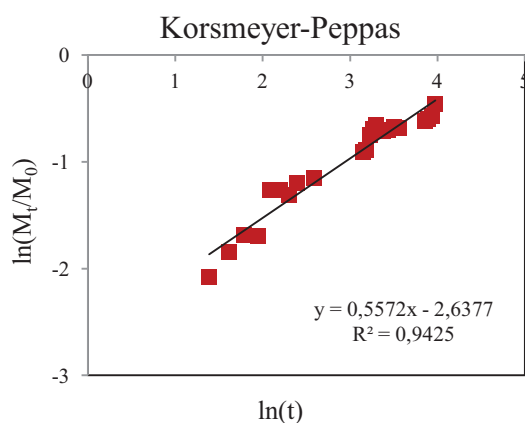


**Figura B. 14-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de libertação da gelatina reticulada sem ouro, GP2, relativamente à cinética de 1ª ordem (a) e o modelo de Higuchi. (b).

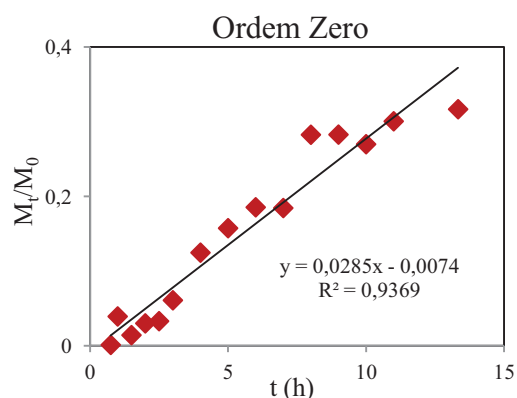


**Figura B. 15-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação da gelatina reticulada sem ouro, GP2, relativamente ao modelo de Hixson-Crowell.

## B.2.2 – Modelação dos dados de liberação para a gelatina não reticulada com ouro, GP2(180ppm)

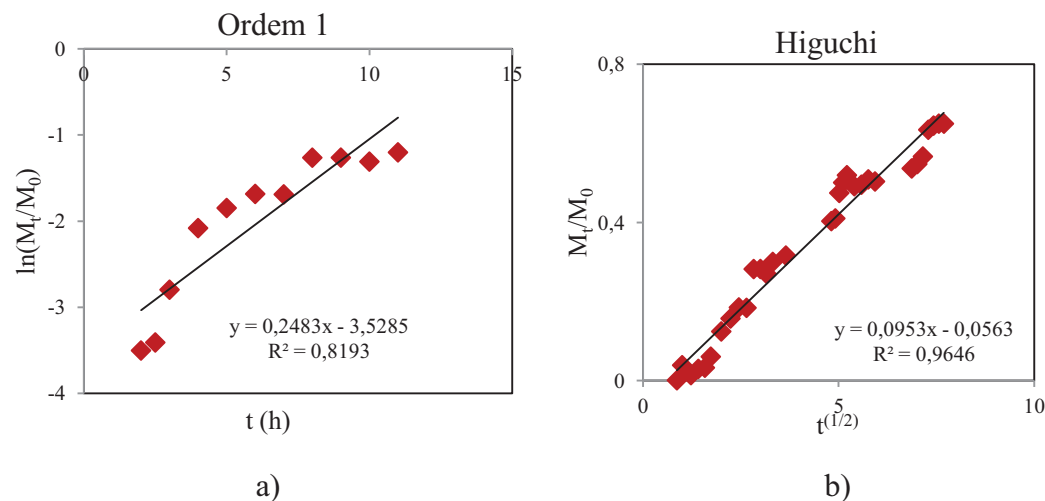


a)

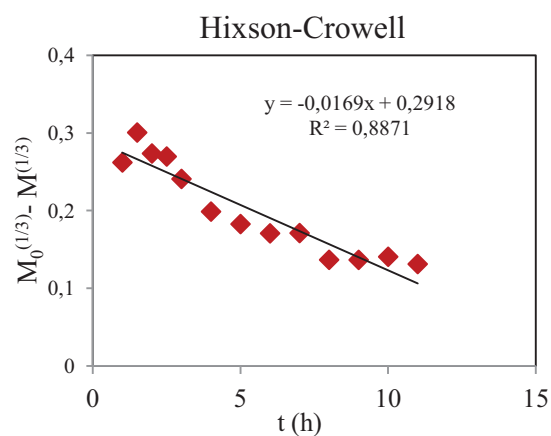


b)

**Figura B. 16-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de gelatina e nanoesferas de ouro, GP2(180ppm), relativamente ao modelo ao modelo Korsmeyer(a) e cinética de ordem zero (b).



**Figura B. 17-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de gelatina e nanoesferas de ouro, GP2(180ppm), relativamente à cinética de 1ª ordem(a) e ao modelo de Higuchi (b).



**Figura B. 18-** Representação do ajuste realizados aos dados experimentais de liberação do nanocompósito de gelatina e nanoesferas de ouro, GP2(180ppm), relativamente ao modelo de Hixson-Crowell.

**ADDIN**